

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**CARACTERIZACIÓN Y TRATAMIENTO
FOTOCATALÍTICO DE HONGOS Y
BACTERIAS DE AIRE INTERIOR**

TESIS DOCTORAL
MARTA SÁNCHEZ MUÑOZ
MADRID, 2013



FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

CARACTERIZACIÓN Y TRATAMIENTO FOTOCATALÍTICO DE HONGOS Y BACTERIAS DE AIRE INTERIOR

Memoria presentada por Marta Sánchez Muñoz para optar al grado de Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid.

Junio de 2013

Director de Tesis: Benigno Sánchez Cabrero
Tutor: Ricardo Amils Pibernat

CIEMAT (Centro de Investigaciones Energéticas Medioambientales y Tecnológicas)
Centro de Biología Molecular Severo Ochoa



A mi madre,
Mamá, Chelo o Consuelito para sus grandes amigos,

Esta tesis finaliza hoy gracias a tu insistencia y apoyo
Gracias por ese último aliento que me llenó de fuerza para seguir adelante

AGRADECIMIENTOS

A mi padre y mi hermano Javi, por estar siempre a mi lado ofreciéndome calor familiar y apoyo en mi carrera profesional. A mi yayo, y a toda mi gran familia de tíos y primos.

Al doctor Aldo González, por abrirme las puertas de su laboratorio y haberme enseñado tanto sobre hongos, gracias por compartir conmigo todas aquellas "horas y horas" de microscopio. Al doctor Ricardo Amils por haber confiado en mí y haberme dado su apoyo en todo momento. Muchas gracias a los dos por supervisar mi trabajo y proporcionarme los medios que necesitaba para llevarlo a cabo.

Al grupo de Aplicaciones Medioambientales de la Radiación Solar en Aire en el CIEMAT, liderado por Benigno Sánchez, por haberme acogido en su seno todos estos años y haber abierto mis ojos al mundo del aire interior. Gracias a todos los que comparten o compartieron su día a día conmigo y no han dudado en ayudarme a resolver dudas e incidencias. Gracias Silvia, Loli, Juan Coronado, Raquel Portela e Ingrid. Gracias a Rafa, Raúl y Gloria por ayudarme en mi trabajo diario. Quiero agradecer también al doctor Guillermo Cobas, que empezó conmigo, todas las lecciones que me dio sobre la vida y el seguir preocupándose por mí después de tanto tiempo y a Emiliano E. Díaz, porque me ayudó a sentar las bases en aquellos primeros días. Por supuesto, no me olvido de María Muñoz, que trabajó codo a codo conmigo todos estos años, por querer aprender de mí y enseñarme tanto al mismo tiempo. A todos los "becarios" del CIEMAT, que han sido mi familia todo este tiempo, gracias por esas comidas aliñadas con carcajadas en el comedor y los "findes rurales". Entre ellos, los chicos del despacho de enfrente: Jose y Sofía, gracias por hacerme reír y por escucharme tantas veces, y por supuesto también a Fran y Víctor. A los chicos de la planta baja del 42, a David, Alberto, por vuestra compañía y afecto, y en especial a Pepín por estar siempre el primero para ofrecerme su mano y levantarme con cada tropiezo, gracias por toda tu ayuda. A Bea, y a las chicas del otro lado de la carretera: Cecilia, Ana, Vane, Natalia y Mary, por vuestra alegría contagiosa. A los que ya se fueron: Juan, Nairobi, Cristóbal, Irene, Henar, Roberto, porque seguís formando parte de mi vida a pesar de la distancia.

A toda la gente que conocí en el CBM que no dudó en hacerme allí un hueco, aconsejarme y ayudarme como Carlotta Vizioli, Nuria 2, Irma Marín y José Luis Sanz. Gracias a Mónica Oggerin y a Nuria Rodríguez por su colaboración en la identificación de mis muestras bacterianas y en especial quiero agradecer a Catalina del Moral y Diego Sánchez su gran trabajo en el análisis de las regiones ITS de mis muestras de hongos.

A Juan Carlos Villar, y a su grupo de Celulosas y papel del departamento de Productos forestales del INIA, por permitirme entrar libremente en sus instalaciones y utilizar sus microscopios.

A mis amigos de Villalba, Dani y Sonsoles y a las biólogas, Aurora, Silvia, Sandra, Helena, Ana, que se formaron conmigo y estarán siempre a mi lado haciendo piña. A Francesca y Luna, por la compañía y cariño que me dan en casa y a Rubén, por animarme a convertirme en doctora.

Finalmente, quiero agradecer a Fernando Feldman y la empresa AIRE LIMPIO por habernos permitido desarrollar y ensayar un primer prototipo de fotorreactor a escala de demostración con el que poner en práctica todo lo aprendido en este trabajo.

INDICE

ABSTRACT

1.INTRODUCCIÓN

<u>1.1. CALIDAD DE AIRE INTERIOR</u>	- 1 -
1.1.1. Contaminantes de aire interior	- 2 -
1.1.2. Normativa	- 3 -
<u>1.2. AEROBIOLOGÍA. HONGOS Y BACTERIAS DE AIRE INTERIOR</u>	- 4 -
1.2.1. Hongos de aire interior	- 5 -
1.2.2. Bacterias de aire interior	- 7 -
<u>1.3. MÉTODOS DE MUESTREO DE MICROORGANISMOS EN AIRE</u>	- 8 -
1.3.1 Muestreo por sedimentación pasiva	- 9 -
1.3.2 Muestreadores inerciales	- 9 -
1.3.3. Muestreadores no inerciales	- 10 -
<u>1.4. TRATAMIENTO DE AIRE. MÉTODOS EXISTENTES</u>	- 11 -
1.4.1 Filtración	- 11 -
1.4.2. Radiación ultravioleta (UV)	- 11 -
1.4.3. Purificadores de aire electrónicos	- 11 -
1.4.4 Ozonización	- 12 -
1.4.5. Control de la presurización	- 12 -
<u>1.5. PROCESOS DE OXIDACIÓN AVANZADA. FUNDAMENTOS DE FOTOCATÁLISIS</u>	- 12 -
1.5.1. Fotocatálisis como sistema de desinfección	- 15 -
1.5.2. Dióxido de titanio	- 17 -
1.5.3. Catalizadores soportados	- 17 -
1.5.4. Reactores fotocatalíticos para el tratamiento de bioaerosoles	- 19 -

2.OBJETIVOS

3.METODOLOGÍA

<u>3.1. MEDIOS DE CULTIVO</u>	- 23 -
3.1.1. Medios para el crecimiento de bacterias	- 23 -
3.1.2. Medios para el crecimiento de hongos	- 24 -
<u>3.2. SOLUCIONES, TAMPONES, ADITIVOS</u>	- 26 -
<u>3.3. MÉTODOS DE TOMA DE MUESTRA DE AIRE</u>	- 26 -
3.3.1. Métodos ensayados para la puesta a punto de una metodología de toma de muestra de aire	- 26 -
3.3.2. Muestreadores de aire	- 26 -
3.3.3. Conteo de unidades formadoras de colonia y correcciones realizadas tras el uso de muestreadores por impacto en placa	- 30 -

3.3.4. Aplicación de la norma UNE 171330-2:2009 para el cálculo del número de puntos de muestreos.....	- 30 -
<u>3.4. CARACTERIZACIÓN DE HONGOS Y BACTERIAS DE AIRE INTERIOR</u>	- 31 -
3.4.1. Cultivo y aislamiento de hongos	- 31 -
3.4.2. Identificación de hongos filamentosos y levaduras por métodos no moleculares	- 31 -
3.4.3. Caracterización de bacterias	- 32 -
3.4.4. Muestras bacterianas recogidas mediante medio de cultivo.....	- 33 -
3.4.5. Muestras bacterianas recogidas mediante filtros	- 33 -
3.4.6. Muestras bacterianas recogidas mediante solución isotónica o PBS.....	- 34 -
3.4.7. Extracción de ADN de hongos filamentosos y levaduras. Caracterización de hongos por métodos moleculares.....	- 34 -
3.4.8. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	- 35 -
3.4.9. Electroforesis en gel de agarosa.....	- 38 -
3.4.10. Corte con Enzimas de Restricción	- 38 -
3.4.11. Purificación de productos de PCR.....	- 38 -
3.4.12. Medida de la concentración de ADN.....	- 39 -
3.4.13. DGGE (Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante).....	- 39 -
3.4.14 Clonaje	- 40 -
<u>3.5. PUNTOS DE MUESTREO DE BIOAEROSOL</u>	- 41 -
3.5.1. Biblioteca de la facultad de Psicología de la Universidad Autónoma de Madrid	- 41 -
3.5.2. Muestreo de hongos y bacterias en cuatro edificios bioclimáticos con diferentes localizaciones geográficas	- 41 -
3.5.3. Muestreo estacional y caracterización de hongos y bacterias en dos edificios de diferente edad de Madrid	- 43 -
<u>3.6. TRATAMIENTO FOTOCATALÍTICO DE AIRE INTERIOR</u>	- 44 -
3.6.1. Reactor fotocatalítico tubular a escala de laboratorio.....	- 44 -
3.6.2. Reactor a escala demostración	- 48 -
<u>3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</u>	- 51 -

4. RESULTADOS

<u>4.1. PUESTA A PUNTO DE UNA METODOLOGÍA DE TOMA DE MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS DE AIRE</u>	- 53 -
4.1.1. Caracterización de bioaerosoles mediante métodos de muestreo pasivos de una biblioteca universitaria.	- 53 -
4.1.2. Caracterización de bioaerosoles por métodos pasivos y activos en tres ambientes diferenciados: Madrid-Soria-Almería.....	- 56 -
<u>4.2. COMPARACIÓN DE TRES MUESTREADORES POR IMPACTO EN PLACA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS EN AIRE INTERIOR</u>	- 65 -
4.2.1. SPIN AIR V2-DUO SAS SUPER 360 (A.).....	- 65 -
4.2.2. SAMPL' AIR -DUO SAS SUPER 360 (B.).....	- 67 -
4.2.3. SPIN AIR -DUO SAS SUPER 360- SAMPL' AIR (A.-B.)	- 69 -
<u>4.3 CARACTERIZACIÓN ESTACIONAL DE BIOAEROSOL</u> EN DOS EDIFICIOS DE DIFERENTE EDAD EN MADRID.	- 70 -
4.3.1. Resultados de UFC/m ³ de bacterias.....	- 70 -

4.3.2. Correlación de las UFC/m ³ de bacterias con la temperatura, humedad relativa y UFC/m ³ de hongos.....	- 73 -
4.3.3. Resultados de UFC/m ³ de hongos.....	- 74 -
4.3.4. Relación Interior/Exterior (I/E) de hongos y bacterias	- 78 -
4.3.5. Correlación de las UFC/m ³ de hongos con la temperatura y humedad relativa.....	- 79 -
4.3.6. Identificación de hongos.....	- 79 -
<u>4.4. ACTIVIDAD FOTOCATALÍTICA Y FOTOLÍTICA DE UN REACTOR TUBULAR A ESCALA DE LABORATORIO</u>	- 81 -
4.4.1. Actividad bactericida.....	- 81 -
4.4.2. Actividad fungicida.....	- 83 -
4.4.3. Análisis SEM- EDX.....	- 84 -
4.4.4. Análisis a largo plazo de la eficiencia del sistema fotocatalítico.....	- 84 -
<u>4.5. ACTIVIDAD FOTOCATALÍTICA Y FOTOLÍTICA DE UN REACTOR A ESCALA DE DEMOSTRACIÓN</u>	- 87 -
4.5.1. Efecto del tiempo de irradiación con luz germicida UV-C (fotólisis).....	- 88 -
4.5.2. Efecto de la cantidad de irradiación germicida UV-C (fotólisis).....	- 91 -
4.5.3. Tratamiento fotocatalítico de hongos y bacterias de aire interior.....	- 91 -
 <u>5.DISCUSIÓN</u>	
<u>5.1. CARACTERIZACIÓN DE HONGOS Y BACTERIAS DE AIRE INTERIOR MEDIANTE EL USO DE DIFERENTES METODOLOGÍAS</u>	- 93 -
<u>5.2. EVALUACIÓN DE MUESTREADORES POR IMPACTO EN PLACA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS</u>	- 98 -
<u>5.3 CARACTERIZACIÓN ESTACIONAL DE HONGOS Y BACTERIAS DE AIRE INTERIOR EN DOS EDIFICIOS DE EDADES DIFERENTES</u>	- 100 -
<u>5.4. ENSAYOS FOTOCATALÍTICOS Y FOTOLÍTICOS A ESCALA DE LABORATORIO</u>	- 103 -
<u>5.5. ENSAYOS FOTOLÍTICOS Y FOTOCATALÍTICOS A ESCALA DEMOSTRACIÓN</u>	- 105 -
 <u>6. CONCLUSIONES</u>	- 108 -
 <u>7. BIBLIOGRAFÍA</u>	- 110 -

ANEXO I

ANEXO II

ABSTRACT

Nowadays, people in developed countries spent most of their time in different indoor environments and the concern about indoor air quality has increased at the same time as the illnesses related with unhealthy buildings. Indoor Air Quality (IAQ) can be significantly deteriorated by high levels of bioaerosols that may cause infections, toxic reactions or allergies in building occupants. Indeed, there is no standard method for the quantification of this kind of pollution and several protocols and sampling devices are used. Consequently, there is an increasing demand for a systematic control of the indoor bioaerosols and efficient air purification systems.

In this study, several methods for air sampling were tested such as gravitational settling on agar surfaces (sedimentation plates) or buffers (PBS), filtration or inertial impaction samplers. Moreover, three commonly used portable air samplers were compared: DUO SAS SUPER 360, SAMPL'AIR and SPIN AIR units and tested simultaneously for bacteria quantification in a laboratory room in realistic conditions.

A fungal and bacterial characterization was done in buildings with different geographical location (Almería-Madrid-Soria), different age and at different seasons of the year. Bacterial and fungal samples were incubated and colony-forming units were counted. Polymerase Chain Reaction (PCR) technique (16S ARNr amplification) and subsequent sequencing were used for bacterial species identification. For fungal identification micro- and macro-morphology examination of the colonies were used. Additionally, several samples isolated from Madrid building were identified by the amplification of the Internal Transcribed Spacer (ITS) region. Pathogenic bacteria, such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Francisella tularensis* were isolated in most of the sampled buildings. Fungal identification results showed different species of *Cladosporium*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus* and an important number of yeasts in all the indoor environments sampled. These fungal genera can cause asthma, allergies or a contribution to the development of the Sick Building Syndrome (SBS).

A new approach based on heterogeneous photocatalysis was tested to treat real indoor air. An annular UV-photocatalytic reactor was developed at laboratory scale where real indoor air was treated without recirculation. Results showed an efficient removal of airborne bacteria using TiO₂ photocatalyst supported on transparent polymeric monoliths irradiated with UVA.

As the laboratory scale photocatalytic tests were promising, a second photoreactor was designed, constructed and installed in an office. This demonstration scale photoreactor was attached to an HVAC system and was able to treat the indoor air by both photocatalysis or photolysis. For photocatalytic treatments aluminum monoliths were coated with a TiO₂ sol-gel. The photoreactor was efficient to remove 97-99% of airborne bacteria when the catalyst was illuminated with three lamps during four hours and 81% of airborne fungi when nine lamps were lit inside the reactor.

The experiments performed proved that this technology was efficient for bacteria and fungi removal and could compete with the dangerous conventional photolytic treatment with UVC.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CALIDAD DE AIRE INTERIOR

En los países industrializados, la mayoría de los habitantes se encuentra entre el 80-90% de su tiempo en diferentes ambientes interiores. En ocasiones, la concentración de algunos de los contaminantes presentes en el aire de estos lugares, a menudo percibidos por sus ocupantes como más seguros, es superior a la exterior (Spengler y col., 1983). La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (U.S. EPA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) establecen que la contaminación del aire interior se encuentra entre los principales riesgos para la salud pública, y de hecho, se sabe que cada año, mueren en el mundo miles de personas por enfermedades derivadas de una exposición prolongada a contaminantes de aire interior. La mayoría de estas muertes ocurren en países en desarrollo, en los que aún se queman combustibles, como madera o carbón, para obtener energía dentro de los hogares (U.S. EPA, 1990a, 2001; WHO, 2002, 2009). La OMS considera que disfrutar de una buena calidad de aire es un derecho desde el punto de vista de la salud (WHO, 2000).

A partir de los años 70, con el fin de reducir el consumo de energía, se comenzaron a construir edificios más herméticos, lo que llevó a una reducción de la ventilación natural y a un aumento de la recirculación del aire. Se produjo entonces, al disminuir el intercambio de aire con el exterior, el contraproducente aumento de contaminantes en el interior de los edificios. Además de una insuficiente ventilación, otros factores que contribuyen a disminuir la calidad del aire son el descuido del mantenimiento de los sistemas y conductos del aire acondicionado y calefacción, la distribución deficiente de aire fresco, la disposición inadecuada de las entradas de aire del edificio, un ineficiente sistema de filtración del aire, el uso de materiales sintéticos en la construcción y decoración, la propia contaminación generada en el interior y la entrada de contaminantes procedentes de fuentes de contaminación externa al edificio (U.S. EPA, 2001).

El término aire interior suele aplicarse a ambientes interiores en los que el público general está expuesto: edificios de oficinas, edificios públicos (colegios, hospitales, teatros, restaurantes, etc.), medios de transporte y viviendas particulares. El aire interior alberga una gran cantidad de contaminantes, por lo que es difícil asociar unos efectos adversos en la salud con un contaminante en concreto. Los síntomas que provoca una mala calidad de aire son variados, pudiendo ser parecidos a los del resfriado o la gripe, acompañados de dolores de cabeza, náuseas, irritación de ojos, nariz y garganta, tos seca, piel seca o irritada, falta de concentración, fatiga e incluso, mayor sensibilidad a los olores (Guardino y col., 2001). Al conjunto de estos síntomas se les diagnostica bajo la denominación del **Síndrome del Edificio Enfermo (SEE)**. Este síndrome normalmente no se origina bajo la acción de un solo contaminante sino que en su desarrollo intervienen varios produciendo un efecto sinérgico. La OMS define el SEE como el conjunto de síntomas diversos que presentan los individuos que habitan estos edificios y que no suelen ir acompañados de ninguna lesión orgánica o signo físico, diagnosticándose a menudo por exclusión. A nivel mundial alrededor del 30% de los edificios modernos o remodelados están afectados por el SEE (WHO, 1983). Un edificio se considera enfermo cuando al menos un 20% de sus ocupantes presenta este síndrome. Estos problemas pueden aparecer cuando el edificio se destina a actividades para las que no fue proyectado, aunque la mayoría de las veces, ocurre por un mal diseño en la construcción. Los síntomas desaparecen al abandonar el edificio y vuelven a aparecer al entrar en él (Molina y col., 1989; U.S. EPA, 1991).

Las **Enfermedades Relacionadas con los Edificios (ERE)**, son menos frecuentes pero a



Figura 1.1. Torre Agbar en Barcelona, considerada como un edificio enfermo (Delgado, 2010)

menudo más graves y van normalmente acompañadas de signos físicos definidos. Algunas ERE son enfermedades producidas por hipersensibilidad como asma, rinitis alérgica, dermatitis, neumonía hipersensitiva, fiebre de los humidificadores o también pueden ser enfermedades infecciosas como legionelosis, fiebre de Pontiac, tuberculosis, resfriado común y gripe. Según la OMS, a nivel mundial, la contaminación del aire interior es responsable del 36% de las infecciones de las vías respiratorias bajas y del 22% de las enfermedades obstructivas pulmonares crónicas (WHO, 2002).

1.1.1. Contaminantes de aire interior

El aire interior puede contener una gran variedad de sustancias contaminantes que podrían clasificarse en función de su naturaleza inorgánica u orgánica, su origen biológico o como mezclas de varios contaminantes (Jones, 1999; OSHA, 2011). A continuación se describen brevemente los principales contaminantes que pueden encontrarse en el aire interior:

Contaminantes inorgánicos: como el monóxido de carbono (CO), el dióxido de carbono (CO₂), los óxidos de nitrógeno, los óxidos de azufre, las fibras minerales, el ozono, el radón, el plomo etc. El CO, CO₂, NO, NO₂ y SO₂, se liberan como productos de la combustión de cocinas, estufas, hornos, etc. Además, los seres humanos exhalamos CO₂ de manera continuada como resultado de nuestro metabolismo. En espacios cerrados y mal ventilados estos gases pueden acumularse y provocar, al inhalarse, irritaciones del tracto respiratorio o intoxicaciones (OSMAN, 2001). El ozono (O₃) es un gas oxidante, que se produce debido a una reacción fotoquímica de contaminantes precursores como los óxidos de nitrógeno y los compuestos orgánicos volátiles. Procede fundamentalmente del aire exterior, aunque también pueden producirlo las fotocopiadoras o algunos purificadores de aire. En altas concentraciones produce irritación ocular y de las vías respiratorias, pudiendo llegar a producir daño en los pulmones (WHO, 2003). El radón es un gas radioactivo liberado en la decadencia natural del uranio, que se encuentra formando parte de las rocas y la tierra. Penetra en los hogares a través de las grietas de los edificios y se ha asociado con casos de cáncer de pulmón (WHO, 1998). Los asbestos, utilizados como material de aislamiento y retardante del fuego, y la fibra de vidrio, cuya utilización está regulada, se fragmentan en fibras microscópicas que pueden ser aerosolizadas y respiradas, dañando los pulmones y provocando cáncer a largo plazo (WHO, 1998)

Contaminantes orgánicos: como son los compuestos orgánicos volátiles (COVs), formados por carbono y otros elementos como hidrógeno, oxígeno, flúor, cloro, bromo, azufre, nitrógeno, etc. Los COVs se vaporizan a temperatura ambiente y son liberados por productos de limpieza, ceras, disolventes, adhesivos, pinturas, etc. Los más abundantes son el tolueno, benceno, limoneno, tricloroetileno, formaldehído, fenol y xileno. Algunos COVs pueden causar efectos crónicos y agudos en la salud en altas concentraciones e incluso pueden ser carcinogénicos (U.S. EPA, 1991; UNE 77260-3, 2004).

Mezclas de contaminantes: como el humo de tabaco constituido por una mezcla compleja de compuestos gaseosos y materia particulada. La exposición a humo de tabaco ambiental está asociada al desarrollo de cáncer de pulmón, enfermedades cardiovasculares, trastornos

respiratorios, etc.(WHO, 2007). La materia particulada respirable, procedente del exterior o generada en el interior, se ha asociado con efectos adversos en la salud debido a su deposición en el tracto respiratorio. Constituidas por una compleja mezcla de sustancias orgánicas e inorgánicas, se dividen en dos grupos principales, partículas gruesas (entre 2.5 y 10µm) y finas ($\leq 2.5\mu\text{m}$) (WHO, 2003, 2005). Hay evidencias de que los plaguicidas de uso doméstico, como son los insecticidas, rodenticidas, fungicidas y desinfectantes microbianos, producen daños en la salud y elevan la concentración interior de COVs (U.S. EPA, 1990b).

Contaminantes de origen biológico: incluyen agentes infecciosos como bacterias, hongos, virus, algas, ácaros, insectos patógenos y/o alérgicos, animales vectores de enfermedades, restos orgánicos, micotoxinas, endotoxinas y polen. Se hablará de los microorganismos objeto de este estudio más adelante.

Además de los contaminantes descritos anteriormente, existen otros factores que también contribuyen a empeorar la calidad de los ambientes interiores, como son la presencia de cargas eléctricas, radiaciones, iones, ruido, vibraciones, o una temperatura, humedad relativa e iluminación inadecuadas (Wu y col., 2007).

1.1.2. Normativa

Existen normas para la calidad del aire en exteriores, establecidas con el fin de proteger a la población y se han establecido criterios técnicos y los valores límite legales de algunos contaminantes (Consejo de la Unión Europea, 1999). Algunas de las normas para aire exterior son aplicables a interiores y organizaciones como la Conferencia Gubernamental Americana de Higienistas Industriales (ACGIH) están trabajando en la elaboración de guías sobre límites de exposición para algunos contaminantes químicos y biológicos presentes en ambientes interiores (WHO, 2000, 2010; ACGIH®, 2012a, 2012b). Sin embargo, existen importantes lagunas en los datos relativos a las exposiciones a largo plazo a concentraciones bajas y a mezclas de diferentes contaminantes así como sus efectos carcinogénicos, mutagénicos o reproductivos, por lo que se hace difícil establecer unos valores límite para la mayoría de contaminantes. Las normas de la serie ISO-16000 (Organización Internacional de Normalización) hacen relación a numerosos aspectos de la calidad del aire interior, como la determinación de formaldehído, el muestreo de asbestos y la detección de hongos (ISO 16000, 2012). La Sociedad Americana de Ingenieros de Calefacción, Refrigeración y Acondicionamiento del Aire de Estados Unidos (ASHRAE) también ha elaborado una serie de recomendaciones, que son muy utilizadas para preservar la calidad del aire interior (ASHRAE.org).

En España, el comité Técnico 171 de Calidad de ambientes interiores de AENOR (Agencia Española de Normalización) ha elaborado diversas normas sobre calidad de aire interior como la norma UNE 171330-1 que describe como realizar un diagnóstico de calidad ambiental en interiores (UNE 171330-1, 2008), la norma UNE 171330-2 sobre los procedimientos de inspección (UNE 171330-2, 2009a) y la norma UNE 17330-3 sobre sistemas de gestión de los ambientes interiores (UNE 171330-3, 2010). AENOR, junto con FEDECAI (Federación de Empresas de Calidad Ambiental en Interiores) ha desarrollado un Programa de Certificación de Calidad Ambiental en Interiores para edificios (FEDECAI.org (c), 2001; AENOR (c), 2010).

No existe una normativa aceptada a nivel mundial que establezca unos niveles límite para microorganismos. Se tiende a establecer una relación de unidades formadoras de colonia por metro cúbico (UFC/m³) entre aire interior y exterior (UNE 171330-2, 2009a). Por lo general,

se acepta que los niveles interiores son preocupantes, cuando las concentraciones o poblaciones difieren de los exteriores (Jensen y col., 1998). La norma UNE 100012:2005 considera como valores máximos en aire de ambiente interior los recuentos de 800 UFC/m³, por encima de los cuales se recomienda tomar medidas correctoras e identificar los microorganismos (UNE 100012, 2005).

Una mala calidad de aire es además, causa de absentismo laboral y disminución de la productividad por parte de los trabajadores, lo que se traduce en pérdidas económicas para las empresas (OSHA, 2011).

1.2. AEROBIOLOGÍA. HONGOS Y BACTERIAS DE AIRE INTERIOR

Se ha estimado que un tercio de las quejas sobre calidad de aire interior se deben a la contaminación microbiológica (Lewis, 1995). Los bioaerosoles son partículas transportadas por el aire, constituidas por seres vivos, o moléculas grandes liberadas por seres vivos. Los bioaerosoles son complejos en cuanto a su naturaleza y pueden estar constituidos por virus, bacterias, esporas, polen, protozoos, algas y en general cualquier resto de microorganismos con un diámetro aerodinámico comprendido entre 0.1 y 100 µm (Martí y col., 1991). La aerobiología estudia los microorganismos que pueden provocar efectos adversos en la salud o un impacto ambiental, así como los metabolitos que producen, toxinas (endotoxinas y micotoxinas) y fragmentos de agentes microbianos (fragmentos de paredes celulares, flagelos o material genético) (Fields, 2001). Se ocupa también de conocer los mecanismos de transporte de los microorganismos, su identificación, comportamiento y supervivencia.

El aire es un medio hostil en el que la mayor parte de los microorganismos se encuentran muertos o en forma viable no cultivable. Existe variabilidad en la supervivencia dentro de grupos de microorganismos e incluso dentro de un mismo género. Las esporas fúngicas y bacterianas son más resistentes al estrés ambiental sufrido durante el transporte a través del aire, mientras que las bacterias, algas y virus son más sensibles. La viabilidad de los microorganismos en el aire está influenciada por factores como la humedad relativa (HR%) y la temperatura, la concentración de oxígeno, la radiación solar a la que están sometidos, los contaminantes químicos presentes, las radiaciones electromagnéticas, los iones, el movimiento del aire, la cantidad de luz, etc. (Cox, 1995). Además de poseer barreras estructurales, todos los organismos presentes en la naturaleza poseen mecanismos de defensa y reparación contra el daño fotoquímico y oxidativo (Larson y col., 1988). Existen enzimas que reparan el ADN, tras el daño con luz ultravioleta (UV) germicida (Carell, 1995), y enzimas como la superóxido dismutasa (SOD) (Fridovich, 1986) y la catalasa (Deisseroth y col., 1970), que protegen las células del daño oxidativo.

Los microorganismos se hayan, por lo general, asociados a partículas, formando agregados o en gotas de agua. La mayoría entran a formar parte del aire de forma pasiva, por actividades antropogénicas como el tráfico de vehículos, las plantas de tratamiento de aguas residuales, los centros de manejo de desechos sólidos, etc. Éstos liberan gran cantidad de microorganismos contaminando zonas adyacentes. Fuentes naturales de microorganismos son la vegetación, los animales y el suelo.

En el aire interior, los animales y el hombre constituyen una fuente importante de bacterias patógenas, hongos y virus. Las bacterias y virus son liberados al hablar, toser, estornudar, así como por descamación de la piel y cabello, pudiéndose liberar también hongos.

Las heces de animales son fuente de microorganismos patógenos que pueden ser suspendidos en el aire (Rosas I., 2007).

Se podría decir que el agua y la materia orgánica son dos recursos fundamentales para la vida, por lo tanto, a excepción de los virus que requieren células hospedadoras para su replicación, todas aquellas estructuras en las que se reúnan estos dos requisitos pueden ser consideradas como sustratos colonizables por los microorganismos. Las fugas en tuberías, las goteras, las ventanas mal selladas, las inundaciones, la condensación, pueden dar lugar a condiciones propicias para que éstos crezcan. De hecho, los materiales de los conductos de los sistemas de aire acondicionado y calefacción pueden ser colonizados, dando lugar a reservorios donde se amplifican y son diseminados por todo el edificio. Los microorganismos además, pueden acelerar el deterioro de los materiales de los edificios e incluso producir olores desagradables.

En los últimos años ha aumentado el miedo en la población ante la posibilidad de que agentes biológicos tóxicos o infecciosos sean liberados por terrorismo o guerra, pudiendo provocar enfermedades en grandes poblaciones. La distribución de esporas de ántrax (*Bacillus anthracis*) a través del conducto de ventilación del Capitolio y la sede del gobierno de Nueva York en 2001, es buen ejemplo de ello (Jernigan y col., 2002).

Las principales vías de exposición a los microorganismos del aire son la inhalación, la ingestión y el contacto con la piel, pero la inhalación es la que da lugar a mayores problemas de salud, siendo la vía predominante. En el tracto respiratorio, los microorganismos pueden multiplicarse y ser dispersados como medio de propagación a través del aire exhalado. A través de la tos, pueden producirse gotas en las que viajan patógenos alojados inicialmente en los pulmones, mientras que al hablar o estornudar se dispersan microorganismos de la boca, nariz y garganta del hospedador (Stetzenbach, 2001). Los microorganismos, han desarrollado múltiples estrategias para vencer los mecanismos de defensa de los hospedadores, los cuales, en función del estado de su sistema inmune o también su edad, serán más o menos susceptibles de contagio (Bolashikov y col., 2009).

1.2.1. Hongos de aire interior

Los hongos son un grupo heterogéneo, que habita un amplio rango de hábitats, son heterótrofos y han desarrollado modos muy diferentes para obtener nutrientes. Un gran número sobreviven como saprofitos, obteniendo alimento de materia orgánica como madera, papel, pintura, telas, alimentos e incluso son capaces de crecer sobre materia inorgánica como cristales. Sus células son eucariotas y se reproducen sexualmente y/o asexualmente, mediante esporas, las cuales, tienen gran variedad de tamaños y formas, siendo fundamentales para su dispersión y supervivencia. La mayoría crece formando hifas que se entrelazan para dar lugar al micelio. Los hay unicelulares, las levaduras, que se reproducen por fisión binaria o gemación, mientras que otros son dimórficos y capaces de alternar entre una fase micelial y una fase de levadura (Deacon, 1997a). Algunos hongos son comestibles, y otros se utilizan para la producción de bebidas alcohólicas (*Saccharomyces cerevisiae*), pan o quesos (*Penicillium roquefortii*, *P. camembertii*, etc.). Coloquialmente se les denomina "mohos". La mayoría de esporas de hongos aisladas del aire se encuentran en un rango de tamaño de entre 2 y 10 μm , aunque algunas especies, como las pertenecientes al género *Alternaria*, producen esporas de mayores dimensiones, pudiendo sobrepasar los 40 μm (Reponen y col., 2001; Samson y col., 2004b; Yao y col., 2006a).

Tradicionalmente los hongos se han clasificado en función de sus características morfológicas y por los patrones de desarrollo de las estructuras reproductivas sexuales y asexuales cuando las esporas no son producto de la meiosis. Esta clasificación se sigue utilizando, aunque en la actualidad, se está llevando a cabo un gran esfuerzo por diferentes grupos de investigación para la reorganización de los grupos basada en el análisis de las secuencias de ADN, como el trabajo realizado por el proyecto AFTOL (Assembling the Fungal Tree of Life Project)(Spatafora, 2005). Hawksworth, estimó, en el año 2000 que existían 1.5 millones de especies de hongos en la tierra (Hawksworth, 2000), de las que únicamente se habían descrito 100.000, lo que se traducía en que únicamente se conocía un 7% de los hongos existentes en el planeta (Hawksworth, 2004). En la base de datos del Centro Nacional de Biotecnología (NCBI), hay disponibles, hasta la fecha, 84314 cepas de hongos introducidas, aunque este número puede estar sobreestimado por la presencia de sinónimos, anamorfos (fases asexuales) o identificaciones erróneas (NCBI, 2013).

Whittaker en 1969, asignó a los hongos la categoría de quinto Reino: poseen células eucarióticas pero carecen de pigmentos fotosintéticos (Whittaker, 1969). En el árbol filogenético molecular de la vida, los hongos se clasifican como uno de los linajes, Fungi, del dominio Eukarya, junto con plantas y animales, entre otros organismos (Woese, 1994). Para cuestiones prácticas, se aceptan los siguientes grupos, adoptados por Alexopoulos y colaboradores en 1996: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, Deuteromycota, Basidiomycota y Oomycota (Alexopoulos, 1996).

Géneros presentes comúnmente en aire interior, son los dematiáceos hifomicetes *Cladosporium*, *Alternaria* y *Ulocladium*, los moniliales hifomicetos *Acremonium*, *Aspergillus* y *Penicillium*, el género picnidial *Phoma* y el mucoral *Mucor*. Algunos, como *Cladosporium*, son abundantes en las superficies de las hojas, siendo este género capaz de crecer y producir esporas sobre superficies húmedas. En interiores también son frecuentes las levaduras, destacando *Rhodotorula* (Samson y col., 2004b) (figura 1.2).

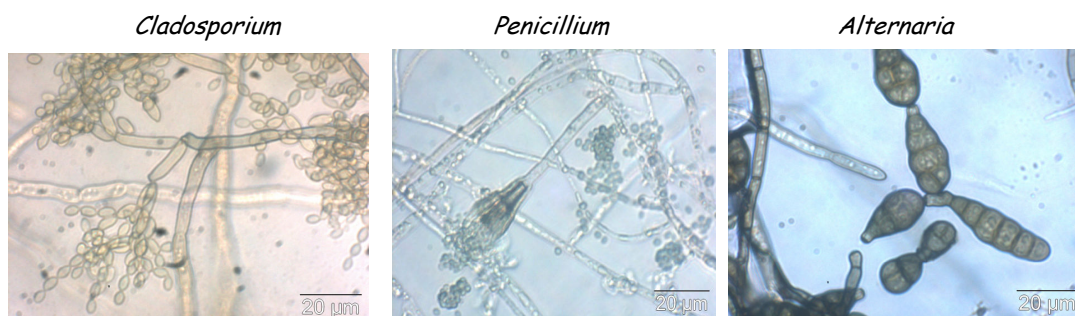


Figura 1.2. Géneros encontrados frecuentemente en aire interior (Olympus Vanox AHMT3 microscope, 1000x) (Sánchez-Muñoz y col., 2011).

Los hongos producen una gran variedad de metabolitos secundarios, algunos de gran valor comercial, como la penicilina mientras que otros, como los compuestos orgánicos volátiles (COVs) pueden ser irritantes o químicos peligrosos. Las micotoxinas son dañinas para humanos y animales y se ha observado que algunas tienen efectos citotóxicos, interfiriendo en la síntesis de ADN, ARN y proteínas, causando apoptosis en células de diferentes órganos. La mayoría de las micotoxinas son moléculas orgánicas heterocíclicas, pudiendo producir un solo género, más de 100 micotoxinas diferentes (Storey y col., 2004). Las Aflatoxinas, por ejemplo, están reconocidas por sus propiedades carcinogénicas (Agencia Internacional de Investigación

del Cáncer), ya que están implicadas en el desarrollo de cánceres respiratorios ocupacionales (Yang y col., 2001; IARC, 2002).

Los hongos son capaces de producir importantes daños en la salud de humanos y animales, pudiéndose clasificar las reacciones que ocasionan en cuatro grupos (Storey y col., 2004) :

1. Infecciones. Pueden ser superficiales en la piel, uñas, pies, pero también más graves, como las pulmonares. Se producen con mayor frecuencia en pacientes inmunodeprimidos.
2. Reacciones alérgicas o de hipersensibilidad. Los hongos son importantes aeroalergenos, pudiendo actuar como antígenos diferentes componentes estructurales de sus paredes celulares, enzimas o productos metabólicos. La exposición a antígenos de hongos se ha asociado con casos de dermatitis alérgica, rinitis alérgica (Huang, 2000; Seuri y col., 2000), asma (Dharmage y col., 2001), neumonía hipersensitiva (Patel y col., 2001) o alveolitis alérgica extrínseca (Yocum y col., 1976). La exposición a bioaerosoles, se ha relacionado con el desarrollo de enfermedades de pulmón intersticiales (ILD) normalmente en personas expuestas a polvos orgánicos. Formas de ILD son la "neumonía intersticial usual (UIP)" y la "fibrosis pulmonar idiopática (IPF)" (Mullen y col., 1998).
3. Reacciones irritantes. Los hongos producen COVs que pueden irritar las mucosas, ojos, producir conjuntivitis e incluso opresión en el pecho. La exposición a constituyentes celulares no volátiles como el beta-1,3 glucano (polímeros de glucosa procedentes de las paredes celulares de hongos) también puede provocar irritación de las mucosas (Wan y col., 1998; Rylander y col., 2000) .
4. Reacciones tóxicas, debido a la exposición a micotoxinas.

1.2.2 Bacterias de aire interior

Las bacterias son organismos unicelulares con estructura celular procariótica. En términos evolutivos, son el grupo de organismos más antiguo de La Tierra, y a pesar de su sencillez, son los más abundantes. Su éxito se debe en gran medida a su gran diversidad metabólica y rápida tasa de multiplicación. Son capaces de adaptarse a ambientes extremos en los que no se dan otras formas de vida (Curtis, 1997). Poseen paredes celulares que mantienen la morfología de la célula además de proporcionar protección mecánica. En función de la estructura de su pared celular, se las clasifica en Gram+ o Gram- (figura 1.3). Algunas bacterias poseen además una cápsula que protege su pared celular y aumenta su capacidad infectiva (Razatos y col., 1998). Las bacterias se reproducen de forma asexual y algunas, como aquellas que pertenecen a los géneros *Bacillus* y *Clostridium*, forman endosporas de paredes resistentes, que les permiten sobrevivir en condiciones ambientales adversas. La mayoría de bacterias ambientales se encuentra en un rango de tamaños de entre 1 y 3 μm (Reponen y col., 2001), aunque se han aislado bacterias de tan solo 0,3 μm (Koch, 1996; Yao y col., 2006a).

Algunas especies son patógenas, como ocurre con el agente causal de la enfermedad del legionario, *Legionella pneumophila*. El estallido de Legionelosis en Philadelphia, en 1976, es uno de los episodios más citados sobre infección con la bacteria *Legionella*. Esta bacteria puede estar presente en suministros de agua caliente, en humidificadores, torres de refrigeración, así como en equipos de terapia respiratoria, jacuzzis, saunas y duchas. Esta bacteria se asocia a dos enfermedades respiratorias: la enfermedad de los legionarios, que es la forma más severa de neumonía y la fiebre de Pontiac (Fraser y col., 1977; Fields, 2001).

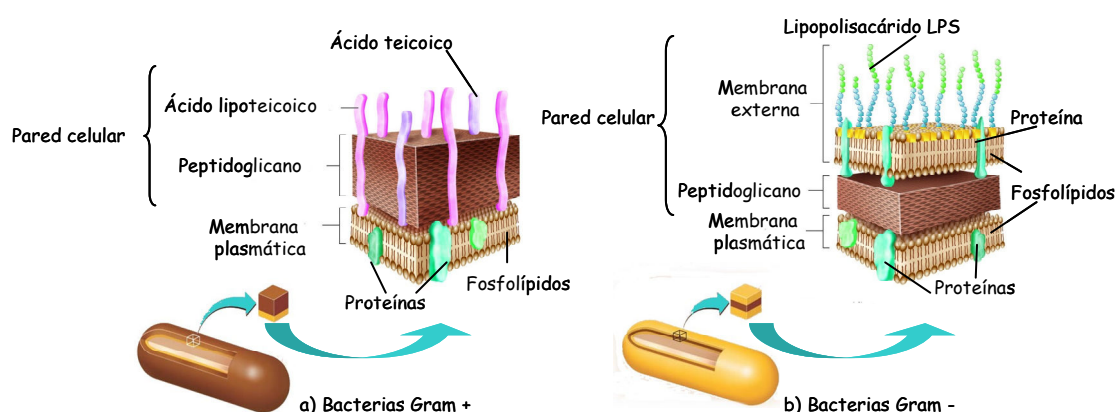


Figura 1. 3. Diferencias en la estructura de la pared celular entre una bacteria a) Gram+ y una bacteria b) Gram-, puede observarse la presencia del lipopolisacárido LPS en su pared (Biology-Forums.com - For All Your Science Needs ©, 2013).

Por otro lado, del aire pueden aislarse numerosos cocos y bacilos Gram+ correspondientes a los géneros *Micrococcus* y *Staphylococcus*, que no provocan efectos adversos en la salud y son comúnmente diseminados por los habitantes de los edificios. Sin embargo, su transmisión en hospitales si puede ocasionar enfermedades nosocomiales en pacientes inmunodeprimidos. La exposición a bacterias del aire, también resulta en la inhalación de endotoxinas, lipopolisacáridos que se encuentran en la pared celular de bacterias Gram- (figura 1.3. b) y cianobacterias. La exposición a endotoxinas puede dar lugar a fiebre, tos, dolor de cabeza, opresión en el pecho y falta de aliento. Las endotoxinas se liberan al ambiente después de la lisis celular, durante el crecimiento activo de la célula o cuando las células bacterianas son fagocitadas por macrófagos. Permanecen relativamente estables en el polvo y están presentes en una gran variedad de ambientes ocupacionales (Olenchok, 2001).

Hoy en día, la clasificación procariótica se basa fundamentalmente en la información que nos proporcionan los ácidos nucleicos, en particular, en la comparación de secuencias muy conservadas del ARN ribosómico. Las bacterias constituyen un dominio independiente dentro del árbol universal de la vida, propuesto por Carl Woese y aceptado mundialmente. Los otros dos dominios estarían formados por Eukarya (eucariotas) y Archaea (procariotas como las bacterias) y compartirían un antecesor común universal con el clado Bacteria. Dentro del dominio Bacteria, existen más de 80 filos diferenciados gracias a la comparación de las secuencias del 16S ARNr (Woese, 1994; Madigan y col., 2009).

1.3. MÉTODOS DE MUESTREO DE MICROORGANISMOS EN AIRE

El muestreo de bioaerosoles se basa en la separación de las partículas del aire utilizando diferentes fuerzas físicas. La forma más sencilla de muestreo es mediante la decantación natural de los microorganismos sobre una superficie determinada. Otros métodos más precisos son los muestreadores que recolectan la muestra de manera activa. Según el tipo de fuerza utilizada, los muestreadores pueden clasificarse en inerciales y no inerciales (Henningson y col., 1994). Los muestreadores inerciales incluyen los impactadores, las jeringas y los muestreadores por centrifugación. Son muestreadores no inerciales los precipitadores electrostáticos y térmicos, así como aquellos que utilizan la filtración.

1.3.1 Muestreo por sedimentación pasiva

La muestra es tomada mediante la exposición al aire de sustratos adhesivos o placas Petri con el medio de cultivo seleccionado (tabla 1.1 [1] (Cox, 1995; Zabiegala y col., 2010).

1.3.2 Muestreadores inerciales

Los muestreadores inerciales se basan en la tendencia de las partículas a desviarse de la corriente de aire, debido a su inercia, cuando éste es forzado a cambiar de dirección por la presencia de una superficie sólida o semisólida. Las partículas con inercia elevada, impactarán con esta superficie (Hernández, 2001). Este tipo de muestreadores se pueden dividir en muestreadores por impacto en medio sólido y líquido.

- **Muestreadores por impacto en una superficie sólida o semi-sólida, impactadores**

- Muestreadores de rendija (slit impactors): en estos muestreadores, el aire penetra a través de una o cuatro rendijas y es impulsado sobre la superficie de impactación.

- Muestreadores multiorificio (multi-hole impactors): el aire pasa a través de placas perforadas con agujeros de un diámetro determinado. El principio de colección es el mismo que el del impactador de rendija, pero con más sitios de deposición. Uno de los muestreadores más conocidos de este tipo es el muestreador para partículas viables Andersen de una sola etapa N6, que consiste en una placa perforada, que se conecta a una bomba de aspiración. Existen un gran número de muestreadores comerciales, que normalmente trabajan con caudales de aire elevados (100-180L/min), son portátiles, autónomos (funcionan con una batería), de bajo peso y llevan incorporada la bomba de succión (Martínez y col., 2004)

- Impactadores en cascada (multi-hole cascade impactors): permiten clasificar las partículas del bioaerosol por tamaños. El aire pasará a través de una serie de placas agujereadas colocadas secuencialmente (Andersen, 1958).

(Tabla 1.1 [2](Thorne y col., 1992; Yao y col., 2006a))

- **Muestreadores por impacto en medio líquido:**

- Frascos borboteadores (impingers): funcionan conduciendo una corriente de aire, por aspiración, al interior de un frasco que contiene un medio de captación, normalmente líquido. El más conocido es el AGI (All Glass Impinger) (Buttner, 1991).

- Frasco borboteador multinivel (size fractionating impingers): Es una modificación del muestreador anterior que dispone de tres niveles y proporciona una separación por tamaño de partícula.

(Tabla 1.1 [3](Thorne y col., 1992; Jensen y col., 1998))

- **Muestreadores por impacto en filtro:**

En la filtración se hace pasar un determinado volumen de aire (mediante una bomba) a través de un filtro y posteriormente se deposita éste sobre un medio de cultivo, para su posterior incubación y conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) o se extrae el ADN para la amplificación de genes específicos de los microorganismos a estudiar. Los bioaerosoles captados se pueden teñir sobre los mismos filtros para su observación directa y conteo al microscopio óptico o de epifluorescencia. (tabla 1.1 [4] (Thorne y col., 1992).

- **Muestreo por centrifugación:**

Los muestreadores de este tipo más conocidos son los ciclones y los muestreadores centrífugos. Se hace rotar el aire y las partículas impactan sobre una superficie de recogida, que puede ser líquida o semisólida, como ocurre en los ciclones, o una banda plástica que contiene agar como en el RCS (Reuter Centrifugal Sampler) (tabla 1.1 [5](Saldanha, 2008)).

1.3.3. Muestreadores no inerciales

- **Precipitación electrostática:**

En este método de colección, las partículas se separan de la corriente de aire por fuerzas eléctricas. Una bomba de aspiración conduce el aire al interior del muestreador que contiene un campo de alto voltaje. Al pasar a través del campo, las partículas se cargan y son atraídas por una superficie de colección metálica con carga opuesta. Este método recoge los bioaerosoles en medio líquido o en un material plano, como el papel de filtro (tabla 1.1 [6](Cox, 1995; Mainelis y col., 2002a; Mainelis y col., 2002b; Yao y col., 2006b)).

- **Precipitación térmica:**

Las partículas pasan a través de un canal estrecho donde hay un gradiente de temperatura perpendicular a la dirección de la corriente de aire. Al entrar en el gradiente, las partículas se mueven en dirección de temperatura decreciente. Las muestras se recogen mediante filtros de papel o portaobjetos de cristal (tabla 1.1 [7](Cox, 1995)).

En el siguiente cuadro se resumen las principales ventajas y limitaciones de cada método de muestreo descrito:

	Ventajas	Limitaciones	Referencias
Sedimentación pasiva	Método económico, equipación sencilla, no depende de conexiones eléctricas, aporta información cualitativa y cuantitativa, útil en estudios iniciales	Método no volumétrico, recogida preferente de partículas con mayor masa, tiempos de muestreo prolongados	[1]
Muestreadores inerciales			
Impacto en superficie sólida o semisólida	Fácil manejo y transporte, ligeros, algunos llevan una batería incorporada, recogen grandes volúmenes de aire en tiempos cortos	Posibilidad de saturación del medio de cultivo, no detecta los no cultivables, estrés de los microorganismos por el impacto y desecación posterior, atracción electrostática por las paredes de la placa	[2]
Impacto en superficie líquida	Posibilita realizar diluciones seriadas y plaquear en diferentes medios para llevar a cabo pruebas bioquímicas. Puede analizarse directamente por técnicas de biología molecular	Puede perderse viabilidad durante el muestreo por hidrofobicidad o la posibilidad de que los microorganismos sufran un choque osmótico. Es posible su reentrada en el flujo de aire por nebulización	[3]
Impacto en filtro	Método relativamente barato y simple que permite el análisis por biología molecular y microscopía. Posibilita la detección de microorganismos viables y no viables	Pérdida de viabilidad por impacto en el filtro y desecación. La recuperación de partículas de los mismos puede ser tediosa	[4]
Centrifugación	Fácil manejo y transporte. Evitan la desecación de los microorganismos cuando el medio de colección es líquido y permiten realizar diluciones	Evaporación del medio de colección líquido. Rápida saturación de las bandas de recogida	[5]
Muestreadores no inerciales			
Precipitación eléctrica	La velocidad de impacto con la superficie de colección es menor sufriendo los microorganismos menores daños	Las cargas aplicadas a los microorganismos pueden afectar a la supervivencia de los más sensibles. Pueden dar lugar a ozono y óxidos de nitrógeno	[6]
Precipitación térmica	Eficiente para la recolección de partículas pequeñas, produce poca caída de presión	Pequeña área de colección. Las temperaturas generadas pueden afectar adversamente a algunos microorganismos	[7]

Tabla 1.1. Ventajas y limitaciones de las diferentes metodologías de muestreo de bioaerosoles.

1.4. TRATAMIENTO DE AIRE. MÉTODOS EXISTENTES.

Existen numerosas tecnologías que buscan la prevención de enfermedades a través de la purificación del aire interior (Emmerich y col., 2013). Algunas de ellas se encuentran disponibles comercialmente, mientras que otras aún están en fase de investigación ASHRAE recomienda aumentar la ventilación con aire exterior para diluir los contaminantes interiores (ASHRAE.org). Sin embargo, esto implica pérdidas de energía y un mayor coste económico. Por otro lado, si los niveles exteriores de contaminación son elevados, el aire debe ser tratado o filtrado antes de su entrada al edificio. Los métodos de purificación del aire más comunes se describen a continuación:

1.4.1 Filtración

Hoy en día se utilizan filtros, instalados en los sistemas de ventilación de los edificios, que retienen partículas sólidas como por ejemplo polvo, polen, esporas y bacterias, evitando su entrada y distribución por el interior. Los filtros HEPA (High Efficiency Particle Arresting), fabricados por lo general en fibra de vidrio, son capaces de recoger partículas mayores de 0.3 micras, pudiendo retirar la mayoría de partículas perjudiciales, sin embargo son inefectivos eliminando COVs. Existen filtros diseñados para eliminar gases de la corriente de aire, pero no se suelen utilizar en ambientes no industriales debido a que producen mayores caídas de presión y tienen una vida útil más corta (U.S. EPA, 2009). Por otro lado, si no se renuevan los filtros con determinada frecuencia pueden servir de nichos para el crecimiento de bacterias y hongos, liberándose al aire partículas en mayor concentración que la que había inicialmente. Estas limitaciones se evitan a menudo incorporando lámparas de luz UV que irradian los filtros para inactivar los microorganismos retenidos en ellos (Kowalski y col., 1999).

1.4.2. Radiación ultravioleta (UV)

La radiación solar en el rango de 225-302nm es letal para los microorganismos y se conoce como radiación ultravioleta germicida (UVGI). En general, se utiliza para el tratamiento de áreas pequeñas, colocadas en el techo o en las paredes y también en el interior de conductos de aire. Evitan el crecimiento de microorganismos en filtros o en las superficies en las que se produce condensación de agua (Kowalski y col., 2000). Las lámparas germicidas comerciales contienen vapores de mercurio a baja presión que emiten energía de longitud de onda con un pico en 253.7nm. La radiación UV-C produce daños en el ADN causando la dimerización de las pirimidinas. Éstas son reparadas por la enzima desoxiribopirimidin fotoliasa con baja fidelidad lo que da lugar a mutaciones. Los microorganismos dañados, pierden la capacidad de replicarse por lo que se evita su diseminación (Josset y col., 2007). Tienen el inconveniente de producir daños en la salud, como fotoqueratitis en los ojos y eritema en la piel, por lo que debe evitarse la exposición directa.

1.4.3. Purificadores de aire electrónicos

Los purificadores de aire electrónicos, como los precipitadores electrostáticos y los generadores de iones, atrapan partículas cargadas mediante atracción electrostática.

Los precipitadores electrostáticos contienen una sección de ionización y una sección de retención. Cuando el aire circula a través de la primera sección, las partículas que contiene se cargan eléctricamente, lo que permite, que al atravesar la segunda sección, queden atrapadas

en unas placas colectoras cargadas con carga eléctrica opuesta. Este tipo de purificador de aire se emplea a nivel industrial para reducir la contaminación atmosférica producida por humos, partículas y otros desechos gaseosos. Son dispositivos de filtración altamente eficientes, que apenas afectan al flujo de los gases a través del dispositivo. Su principal limitación es la difícil limpieza de sus placas colectoras y la posible producción de ozono (Mainelis y col., 2002a).

Los ionizadores son sistemas que producen iones y los dispersan en el aire. Los iones se unen a partículas en suspensión confiriéndolas carga. Por atracción electrostática, las partículas cargadas se depositan sobre las diferentes superficies de la estancia (U.S. EPA, 2009).

1.4.4 Ozonización

Es efectiva en la eliminación de contaminantes químicos y biológicos pero con el inconveniente de que el ozono es tóxico para el ser humano. Además, puede producir productos secundarios no deseados. Se busca que los sistemas que utilizan ozono para desinfección, reduzcan tras el tratamiento, sus niveles a concentraciones ambientales o inferiores (Kowalski y col., 2003).

1.4.5. Control de la presurización

Se utiliza sobre todo en lugares en los que se trabaja con microorganismos patógenos y salas de aislamiento para prevenir la migración de los microorganismos de una zona a otra. Manteniendo una presión negativa, se evita la salida de contaminantes hacia espacios colindantes. Con una presión positiva en la sala, se evita la entrada de flujos de aire que puedan contener microorganismos (Humphreys, 2004).

Un método de tratamiento de aire, nunca debe amenazar la salud de las personas o animales expuestos, ni reducir su sensación de confort. Además se debe minimizar su consumo energético y ha de ser compatible con los sistemas de calentamiento y enfriamiento del aire existentes (Bolashikov y col., 2009). Por ello, se sigue investigando en la mejora de las diferentes tecnologías de tratamiento de aire, para que mediante la combinación de la ventilación con uno o varios tratamientos, se consigan ambientes interiores saludables. En la actualidad, existen a la venta numerosos equipos para purificación que pueden incorporarse en los sistemas de distribución y acondicionamiento de aire de los edificios o a modo de equipos portátiles, provistos de un ventilador que mueve el aire, para el tratamiento de salas pequeñas. Algunos de ellos, se basan en la tecnología fotocatalítica, cuyos principios se describen brevemente a continuación (U.S. EPA, 2009).

1.5. PROCESOS DE OXIDACIÓN AVANZADA. FUNDAMENTOS DE FOTOCATÁLISIS.

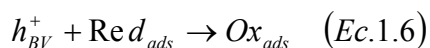
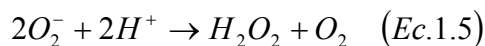
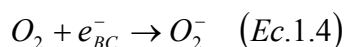
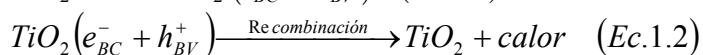
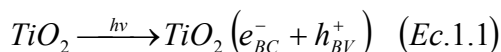
Los **Procesos de oxidación avanzada (POAs)** se basan en procesos físico-químicos capaces de producir cambios profundos en la estructura química de los contaminantes. Éstos involucran la formación de especies transitorias oxidantes e inestables, basadas por lo general en el oxígeno, y denominadas especies reactivas del oxígeno o ROS (Reactive Oxygen Species) (Glaze, 1987; Glaze y col., 1987). Debido a su alta reactividad pueden oxidar sustratos químicos, lo que permite su aplicación en procesos de descontaminación, purificación o remediación. Entre las especies reactivas, destaca el radical hidroxilo (OH^\bullet) generado en la

mayoría de los procesos. Este radical posee alta efectividad para la oxidación de materia orgánica y puede ser generado por medios fotoquímicos o por otras formas de energía. Es capaz de reaccionar 10^6 - 10^{12} veces más rápido que oxidantes alternativos como el O_3 y después del flúor, es el oxidante más energético. Su potencial de oxidación frente al electrodo de hidrógeno (E_0 , 25°C) es de 2.80V, estando por debajo del flúor (3.03V) y por encima del oxígeno atómico (2.42V), el ozono (2.07V) y el peróxido de hidrógeno (1.78V) (Legrini y col., 1993).

Los POAs tienen la capacidad de llevar a cabo una profunda mineralización de los contaminantes orgánicos y la oxidación de compuestos inorgánicos hasta dióxido de carbono e iones como cloruros, nitratos, etc. Son de especial interés los procesos capaces de utilizar la radiación solar como la fotocatalisis heterogénea y la fotocatalisis homogénea con foto-fenton, ya que eliminan el inconveniente de utilizar lámparas que consumen energía. En la fotocatalisis homogénea, los elementos que participan se encuentran en la misma fase, mientras que en la heterogénea, el catalizador y los contaminantes a tratar se encuentran en diferente fase (sólido-gas)(Teichner, 2008).

La **fotocatalisis** es uno de los POAs más aceptados. Consiste en la oxidación de un compuesto mediante radicales hidroxilo, generados a partir de un catalizador semiconductor, que es activado por radiación ultravioleta. Los componentes necesarios para que la reacción fotocatalítica en fase gas tenga lugar son: un compuesto a degradar; un compuesto oxidante como es el oxígeno contenido en el aire; un medio donde se produce la reacción, en este caso el propio aire; un fotocatalizador como es el dióxido de titanio u otro compuesto semiconductor y una fuente de luz ultravioleta. Para que la reacción tenga lugar los fotones, las moléculas de agua y los contaminantes deben estar en la superficie del catalizador al mismo tiempo. Las moléculas de agua se encuentran en el aire en forma de vapor de agua, lo que depende de la humedad relativa (Formenti y col., 1971; Gravelle y col., 1971; Sánchez y col., 2004)).

Cuando la superficie del semiconductor, generalmente TiO_2 , es irradiada con un fotón ($\lambda \leq 387nm$) con la energía suficiente para generar un salto de un electrón desde la banda de valencia (BV) hasta la banda de conducción (BC), se genera un par electrón-hueco (Ecuación 1.1) (figura 1.4). Los electrones y huecos tienen un tiempo de vida corto y si no reaccionan pueden recombinarse rápidamente disipando la energía en forma de calor, un fotón, o calor y un fotón (ecuación 1.2). Las moléculas de agua ambiental, pueden reaccionar con los huecos, cediendo un electrón y produciendo radicales hidroxilo y protones (ecuación 1.3), por otro lado las moléculas de oxígeno pueden aceptar electrones de la banda de conducción dando lugar a iones superóxido (ecuación 1.4). Cuando los contaminantes orgánicos presentes en el aire se adsorben en la superficie del semiconductor, allí donde se forme un hueco (h^+) podrá tener lugar la oxidación del contaminante mientras que allí donde lleguen los electrones podrá tener lugar un proceso de reducción (ecuaciones 1.6 y 1.7). Además puede producirse agua oxigenada como resultado de la reacción entre los radicales superóxido y los protones liberados en las reacciones anteriores (ecuación 1.5). (Fox y col., 1993; Hoffmann y col., 1995; Linsebigler y col., 1995).



Los radicales son los principales causantes de las reacciones de oxidación de contaminantes orgánicos mediante la ruptura progresiva de sus enlaces. Mediante fotocátalisis heterogénea, se ha demostrado la descomposición total de compuestos orgánicos simples y complejos. De este modo las moléculas orgánicas pueden descomponerse para formar dióxido de carbono, agua y ácidos minerales como productos finales. Una revisión de los orígenes de la fotocátalisis y de sus mecanismos de reacción puede encontrarse en (Teichner, 2008).

En los últimos 20 años, el interés que ha suscitado la investigación en fotocátalisis ha aumentado gradualmente debido a que sus numerosas aplicaciones, como la descontaminación de agua y aire, eliminación de olores o producción de superficies autolimpiables y autoesterilizables, pueden ayudar a solucionar problemas ambientales. Se la conoce como un proceso seguro, barato, con bajo consumo de energía, que no consume químicos oxidantes y tiene larga vida. Las investigaciones se han centrado en la búsqueda del catalizador idóneo, el diseño de reactores fotocatalíticos, el análisis de susceptibilidad de compuestos y microorganismos de diversa naturaleza a ser degradados, así como en las posibilidades que ofrece para la producción de hidrógeno asistida por luz (Kawai y col., 1979; Fujishima y col., 2006; Fujishima y col., 2008). La mayoría de las publicaciones se corresponden al tratamiento de aguas, mientras que es en el tratamiento de aire donde se pueden encontrar mayor número de patentes (Paz, 2010).

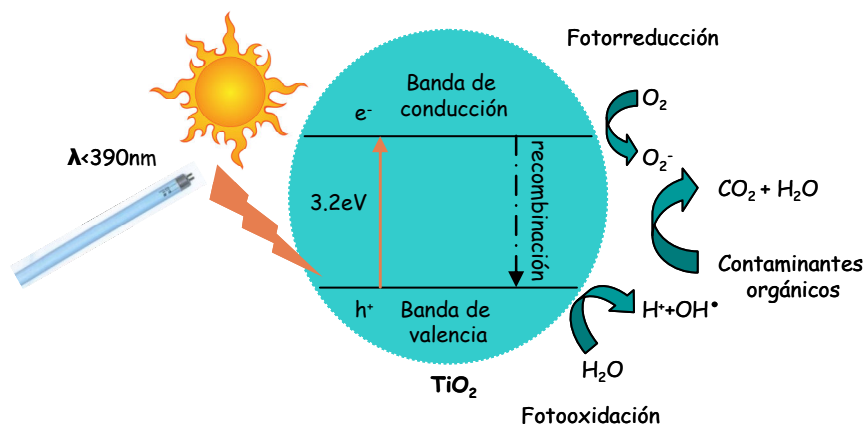


Figura 1. 4. Mecanismo de la reacción fotocatalítica con dióxido de titanio como catalizador.

El principal inconveniente que presenta esta tecnología es la posible formación de especies químicas secundarias, productos de oxidaciones incompletas de los contaminantes existentes y que incluso pueden llegar a ser más tóxicos que éstos (Zhang y col., 2011).

1.5.1. Fotocatálisis como sistema de desinfección

La tecnología fotocatalítica, revelada como técnica de desinfección microbiana por Matsunaga en 1985, se presenta como una de las soluciones viables para resolver el problema de contaminación en interiores de COVs y microorganismos (Matsunaga y col., 1985; Goswami, 2003). Se ha comprobado su efectividad en la destrucción de bacterias, virus, hongos, algas, protozoos e incluso células cancerígenas. La mayoría de estudios se han realizado en agua, mientras que en aire, el trabajo pionero fue publicado por Goswami (Goswami, 1995). Su grupo demostró la destrucción de *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* y el bacteriófago MS2 en un reactor fotocatalítico con recirculación de aire utilizando como catalizador TiO_2 dopado con plata (Vohra y col., 2005; Vohra y col., 2006).

El mecanismo por el que las células mueren no se ha clarificado completamente, pero hay evidencias de que en el caso de bacterias, el contacto con el TiO_2 , provoca un daño oxidativo en la membrana celular que altera el transporte de membrana y afecta a la actividad respiratoria. Matsunaga demostró ya en 1985 que las células microbianas son oxidadas fotoquímicamente en un electrodo de grafito y que la transferencia de electrones entre el electrodo y las células microbianas es mediada por la CoA. La oxidación electroquímica de las células microbianas resultó en muerte celular cuando un potencial constante era aplicado a células de *S. cerevisiae* unidas a la superficie del electrodo (Matsunaga y col., 1985; Matsunaga y col., 1988).

Maness y colaboradores estudiaron la peroxidación de los fosfolípidos poliinsaturados que componen la membrana lipídica por acción de las especies reactivas de oxígeno (ROS), formadas en el proceso fotocatalítico. Vieron que funciones como el transporte de membrana, la semipermeabilidad, la respiración y la fosforilación oxidativa, que dependen de una membrana intacta, se pierden tras el tratamiento fotocatalítico, desencadenando la muerte celular (Maness y col., 1999). Al perderse la permeabilidad de la membrana y su fluidez, la célula es menos capaz de absorber nutrientes y se vuelve más vulnerable al estrés osmótico (Yeung y col., 2009). De hecho, los aldehídos que se producen en la reacción de peroxidación también pueden actuar dañando proteínas y otros componentes celulares. Las especies reactivas de oxígeno, una vez fragmentada la pared celular, entran dentro de la célula y reaccionan con las biomoléculas, inactivando enzimas y dañando el ADN. Sunada K. y colaboradores, comprobaron la supervivencia de células de *E. coli* (Gram -) sobre una capa fina de TiO_2 en función del tiempo de iluminación y vieron que el mecanismo de desinfección estaba formado por dos pasos, uno inicial, de baja velocidad, seguido de otro de alta velocidad. Analizaron los cambios de concentración de componentes de la membrana de *E. coli* como el LPS, de la membrana externa, y el peptidoglicano. Concluyeron que estos dos pasos se deben a una primera desorganización de la membrana externa, más lenta, seguido de una desorganización de la membrana interna, tras lo cual el proceso de desinfección se aceleraba (figura 1.5)(Sunada y col., 2003).

Se piensa que la morfología de las nanopartículas y sus propiedades superficiales son fundamentales en estos mecanismos: la rugosidad a nanoescala, aumenta los puntos de contacto entre las células y la superficie del TiO_2 causando daños en múltiples localizaciones que debilitan y matan al microorganismo. Saito y colaboradores, vieron que tras el tratamiento fotocatalítico de *Streptococcus sobrinus* se liberaban K^+ , ARN y proteínas desde el citoplasma. Por microscopía electrónica de transmisión vieron la destrucción completa de las células (Saito, 1992).

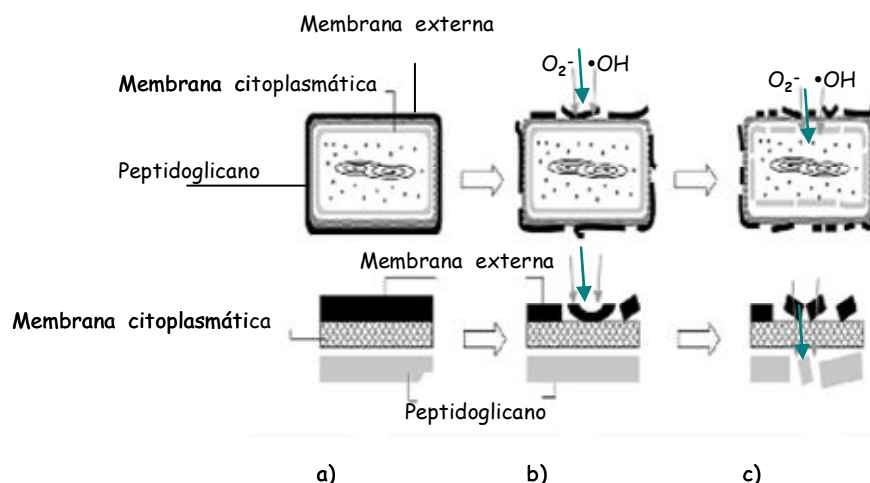


Figura 1. 5. (a-c) Esquema del proceso de eliminación de *E. coli* sobre una lámina de TiO_2 , por fotocatalisis (Sunada y col., 2003).

Jacoby y colaboradores estudiaron la oxidación completa de células de *E. coli* a CO_2 , utilizando tres técnicas: microscopía electrónica de transmisión, marcado con el isótopo radioactivo ^{14}C y medidas realizadas en un reactor fotocatalítico, midiendo el CO_2 formado tras la oxidación (Jacoby y col., 1998). Wolfrum y colaboradores continuaron el estudio observando el balance de masa y los datos cinéticos para la oxidación total de células, esporas y biomoléculas depositadas en superficies con dióxido de titanio y en contacto con el aire. Para ello utilizaron un reactor con recirculación acoplado a un detector de infrarrojo no dispersivo (NDIR) que permitía la detección de CO_2 . No observaron diferencias significativas entre las velocidades de oxidación de bacterias Gram+ y Gram- o entre esporas bacterianas y las bacterias, empleando como superficies discos de cuarzo con una capa opaca de TiO_2 . Las esporas fúngicas si que demostraron ser más resistentes a la oxidación que el resto de estructuras. Los componentes moleculares utilizados, que se encuentran formando parte de microorganismos y biofilms, se oxidaron a velocidades mayores que las células completas (Wolfrum y col., 2002).

La eficiencia de la desinfección fotocatalítica está limitada por varios factores, como por ejemplo, el tipo de microorganismo/os, utilizado en los ensayos. Por lo general se piensa que son más sensibles los virus, seguidos de las bacterias y los hongos. Las esporas bacterianas y fúngicas, debido a la complejidad de sus paredes celulares, son mucho más resistentes y necesitan de tratamientos más prolongados para su inactivación (Chen y col., 2010). También es importante su concentración, cada sistema fotocatalítico en función de su diseño, será efectivo para un rango de concentraciones determinado (Benabbou y col., 2007). Por otro lado, se asume que a humedades relativas altas la eficiencia de la reacción fotocatalítica es mayor, debido a la reposición de grupos hidroxilo sobre la superficie del catalizador, sin embargo si las partículas de catalizador se cubren de agua, los contaminantes tendrán menos opciones de entrar en contacto con su superficie (Dibble y col., 1990). Goswami y colaboradores concluyeron en sus trabajos que las humedades relativas óptimas para obtener un 99% de desinfección estaban entre el 40 y 70%, obteniéndose los mejores resultados con un 50% de HR% (Goswami y col., 1997). La temperatura del aire tratado es importante en el sentido de que temperaturas demasiado altas o bajas influyen en la viabilidad de los microorganismos. Además, la humedad relativa es dependiente de la temperatura ambiental, puesto que temperaturas altas se traducen en humedades relativas bajas, disminuyendo como consecuencia, el agua disponible para los microorganismos suspendidos en el aire. Otro factor

a tener en cuenta es el tiempo de residencia, definido como el tiempo transcurrido desde la entrada de una partícula en el reactor hasta su salida. Un mayor tiempo de residencia permite un mayor contacto de los contaminantes con el catalizador y por ello aumenta las posibilidades de oxidación completa de los mismos (Blanco y col., 2004). Por último, se debe tener en cuenta, el estrés sufrido por los microorganismos en el proceso de generación de bioaerosoles artificiales. La propia aerosolización puede estar debilitando a los microorganismos que como consecuencia serán más sensibles al tratamiento fotocatalítico. Por ello, es recomendable que los microorganismos se encuentren en unas condiciones lo más reales posibles, evitándose así resultados experimentales exageradamente optimistas.

1.5.2. Dióxido de titanio

El TiO_2 (dióxido de titanio) cristalino es un sólido blanco, insoluble y con tamaño de partícula de entre 10-300nm en los preparados sintetizados industrialmente (figura 1.6.). Además de su empleo como catalizador, el dióxido de titanio se utiliza como material en la preparación de pigmentos, sensores, células fotovoltaicas y como agente blanqueante en pinturas, papel, pasta de dientes, plásticos, cosméticos, productos farmacéuticos, etc.



Figura 1. 6. Dióxido de titanio

Su toxicidad se considera baja, sin embargo, se recomienda evitar la inhalación de partículas de TiO_2 de tamaño nanométrico, ya que pueden alcanzar fácilmente los pulmones (IARC, 2010). Es un semiconductor relativamente barato y estable químicamente siendo el catalizador más utilizado para la oxidación fotocatalítica. La energía necesaria para activarlo debe ser mayor o igual a 3.2 eV, la cual se corresponde con la radiación UV cercana de una longitud de onda inferior a 387nm. El requerimiento de radiación UV supone un escaso aprovechamiento del espectro solar, pues esta radiación supone únicamente alrededor de un 5% de la radiación incidente (Fujishima y col., 2000).

Su forma particulada y su elevada superficie específica facilita la adsorción de sustratos que serán oxidados. Existen cuatro estructuras principales del TiO_2 , de las cuales, la anatasa y el rutilo, son las más utilizadas, considerándose la anatasa más activa fotocatalíticamente que el rutilo. Todas las fases del TiO_2 están constituidas por octaedros TiO_6 ligeramente deformados que se unen compartiendo vértices o aristas para constituir la estructura cristalina (Fujishima y col., 2008). El material más empleado de entre las diferentes formulaciones del TiO_2 es el denominado Degussa P25, fabricado por la compañía química alemana Degussa (Evonik Industries). Consiste en una mezcla de cristales de anatasa y rutilo nanométricos en proporción aproximada 3:1 (Bickley y col., 1991).

1.5.3. Catalizadores soportados

Para el tratamiento fotocatalítico de aguas, el dióxido de titanio se ha utilizado a menudo en suspensión, consiguiéndose así un buen contacto entre los contaminantes y el catalizador. Sin embargo, para evitar las etapas posteriores de recuperación del catalizador y para su empleo para el tratamiento de aire, se han buscado diferentes maneras de inmovilización del mismo sobre distintos sustratos. El TiO_2 se puede depositar sobre el soporte o incorporarse en el proceso de fabricación del mismo (fotocatalizadores máscicos), eligiéndose a menudo

matrices porosas con gran capacidad de adsorción de los contaminantes (Avila y col., 1998; Suárez y col., 2008).

Cuando se busca recubrir un soporte, se deben tener en cuenta factores como la adherencia del catalizador al mismo, así como, que dicho soporte sea resistente a la fotooxidación y tenga buena resistencia química y mecánica. Por otro lado, debe minimizarse la pérdida de actividad del catalizador con su unión al soporte y se debe maximizar el área expuesta a la corriente de aire y luz. Para la deposición de catalizadores sobre soportes, se emplean técnicas como el "dip-coating", "slip-casting", "chemical vapour deposition", "sputtering", y "electrospray". Por lo general, se busca que el catalizador forme películas finas sobre el soporte y que no sufra un envenenamiento prematuro, es decir, que mantenga su actividad a lo largo del tiempo (Candal y col., 2004). Para la fabricación de soportes, se han utilizado numerosos materiales y formas, adaptados a las diferentes configuraciones de los reactores empleados en los ensayos fotocatalíticos:

En numerosos estudios se ha preferido el empleo de soportes de metal, como acero inoxidable, aluminio o titanio, zeolitas, materiales cerámicos o telas, entre otros materiales (figura 1.7) (Ha y col., 1996; Pozzo y col., 1997; Candal y col., 1999).

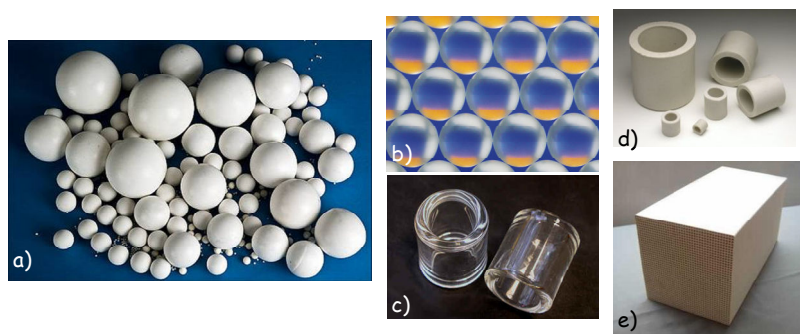


Figura 1.7. Estructuras cerámicas o de cristal utilizadas comúnmente como soporte o matriz que contendrá el catalizador: a) y b) bolas, c) y d) anillos Raschig, e) panel de abeja (Alumina Ceramic, Technology co.; Hilgenberg ©, Applied Catalysts ©).

Los soportes fabricados con cuarzo y vidrio de borosilicato, por ejemplo, proporcionan numerosas ventajas ya que presentan buena adherencia para el catalizador y son transparentes, por lo que se maximiza la superficie del catalizador expuesta a la luz UV. El uso de polímeros orgánicos con alta transmitancia en la región del UVA como sustratos, puede resultar también muy ventajoso ya que los plásticos además de baratos, son materiales ligeros que pueden adaptarse fácilmente en una gran variedad de formas geométricas (Portela y col., 2007a; Portela, 2009; Sánchez y col., 2012).

Con respecto a las formas de los soportes, los anillos Raschig, pequeñas piezas tubulares que proporcionan alta superficie (Coronado y col., 2008) o las bolas (Miranda-García y col., 2011), facilitan el contacto con el contaminante pero producen caída de presión cuando se introducen en los reactores para el tratamiento de aire (figura 1.7.). Otros estudios prefieren el empleo de filtros como soporte para el catalizador (Lin y col., 2003), placas (Sunada y col., 1998) o las propias paredes del reactor (Matthews, 1987).

Los monolitos, o estructuras en forma de panel de abeja, son la configuración más versátil de catalizadores soportados porque causan una caída de presión pequeña (figura 1.7.). El aire

puede circular a través de canales paralelos, aumentando las posibilidades de contacto entre los contaminantes y el catalizador (Avila y col., 2005). El poli (etilén tereftalato) (PET) es un plástico transparente que se haya disponible comercialmente en estructuras en forma de panel de abeja para su empleo como aislante térmico (Hollands y col., 1992). El uso de mononitos de PET también presenta desventajas ya que como otros polímeros, puede ser dañado por la radiación UV, además de poseer una elevada sensibilidad térmica y escasa afinidad por el semiconductor (Portela, 2009). Por ello es importante determinar la influencia del TiO_2 en la estabilidad a largo plazo de los monolitos. Otra alternativa es el empleo de monolitos metálicos, como los de aluminio, ligeros y con resistencia mecánica lo que permite introducirlos en conductos de aire. Su principal desventaja es la opacidad de sus canales.

1.5.4. Reactores fotocatalíticos para el tratamiento de bioaerosoles

Cuando se quiere crear un reactor fotocatalítico es necesario tener en cuenta factores como la velocidad del aire a su paso por el mismo, que determina el tiempo de contacto del microorganismo con el catalizador; la potencia de las lámparas, así como su distancia al catalizador, lo que determina la irradiancia; la presencia de materiales reflectantes; la geometría del reactor; el tipo de catalizador, su dosis y el soporte (Malato y col., 2004).

La mayor parte de estudios fotocatalíticos aplicados a desinfección del aire realizados hasta la fecha, se han basado en reactores experimentales con recirculación de aire, como el diseñado por Goswami y colaboradores, constituido por un conducto equipado con un reactor fotocatalítico. El sistema contenía una entrada por la que se introducía un aerosol que contenía los microorganismos a una concentración conocida, y una salida por la que se tomaban las muestras a distintos tiempos, además de sondas de humedad y temperatura. El catalizador estaba basado en filtros impregnados de TiO_2 , por lo que al mismo tiempo que se filtraba el aire, podía ser tratado al ser iluminado con luz UV (figura 1.8) (Goswami, 2003).

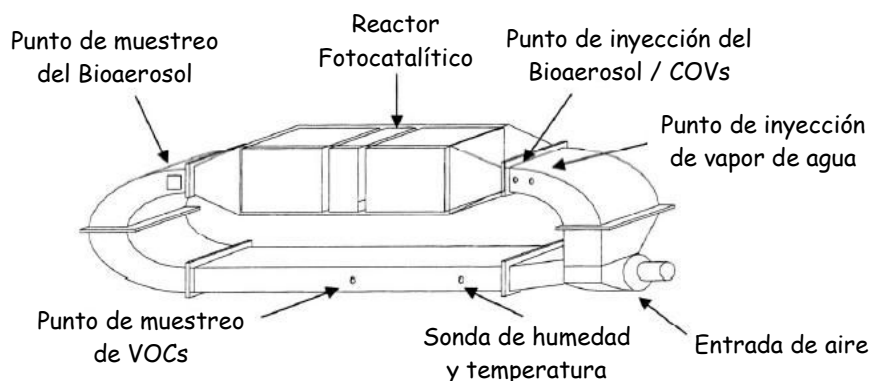


Figura 1. 8. Ejemplo de un reactor fotocatalítico con recirculación de aire (Goswami, 2003).

Guillard y colaboradores patentaron un reactor tubular (Buxair®) con una fuente de luz UV-C y un fotocatalizador basado en TiO_2 que lograba la total inactivación de un aerosol contaminado con el virus A/H5N2, cercano al virus de la gripe A/H5N1 (Guillard y col., 2008). Por otra parte, Josset S. y col. desarrollaron un reactor fotocatalítico con el que trataron aire contaminado con la bacteria *Legionella pneumophila* mediante fotocatálisis con luz UV-A. La novedad de este reactor era su original geometría: utilizaba un ventilador tangencial como soporte fotocatalítico que desplazaba el aire tratándolo simultáneamente. El mismo grupo desarrolló un purificador de aire basado en una versión del citado reactor mejorado (DPA®,

Désinfection Permanente de l'Air, air purifier) que se puede adquirir para su instalación en ambulancias, vehículos funerarios o de rescate, con el objetivo de eliminar la contaminación química (VOCs, NOx, etc.), biológica, los malos olores y los alérgenos (como ácaros y polen) de estos espacios cerrados (BIOWIND group S.A.) (Josset y col., 2007).

Paschoalino y colaboradores diseñaron un reactor de Policloruro de vinilo (PVC) con una lámpara concéntrica de UV-C de 30W. Incorporaron el TiO_2 en un polímero de poliéster ortoftálico y depositaron una capa de éste en las paredes internas del reactor (figura 1.9). Éste reactor se utilizó en condiciones reales y se demostró buena eficiencia en la destrucción de bacterias.

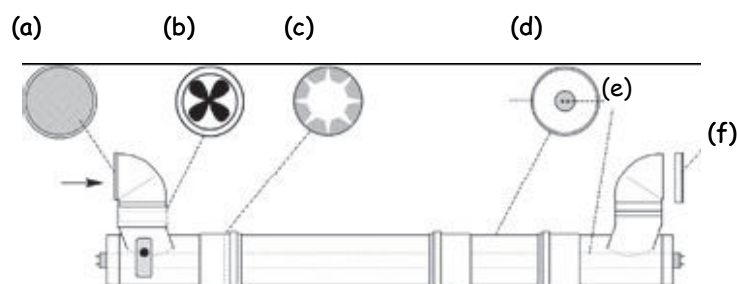


Figura 1.9. Reactor fotocatalítico desarrollado para desinfectar aire interior: (a) red protectora, (b) ventilador, (c) deflector, (d) pared interna con OP/ TiO_2 depositado, (e) lámpara UV (254 nm) y (f) placa Petri (Paschoalino y col., 2008).

Las altas eficiencias para la destrucción de microorganismos demostradas en la mayor parte de estudios llevados a cabo a escala de laboratorio, en condiciones controladas, pueden no ser luego reproducibles en el tratamiento de aire interior real. Por ello, se hace necesario el ensayo con prototipos capaces de tratar grandes volúmenes de aire, y que trabajen en condiciones lo más reales posibles siendo capaces de producir desinfección y purificación del aire al mismo tiempo. Los reactores fotocatalíticos se pueden integrar en los sistemas de aire acondicionado y calefacción existentes o se pueden utilizar como unidades de limpieza del aire independientes.

2. OBJETIVOS

La preocupación del ser humano por la calidad del aire que respira en los diferentes ambientes interiores, en los que habita, ha ido aumentando a medida que se han ido detectando en la población nuevas enfermedades relacionadas con los edificios. De entre las tecnologías existentes para la descontaminación del aire interior, la fotocatálisis heterogénea emerge como una buena alternativa para la eliminación de contaminantes químicos y biológicos del aire mediante su oxidación completa a dióxido de carbono y agua.

El presente trabajo consta de dos partes fundamentales:

- en una primera etapa, se ha buscado una metodología óptima para la caracterización de hongos y bacterias en aire de diferentes estancias interiores, estableciéndose al mismo tiempo, una base de conocimiento y práctica al respecto.
- en una segunda etapa se ha trabajado en el desarrollo y puesta a punto de un equipo para el tratamiento de aire por fotocatálisis.

Siendo el objetivo principal del presente trabajo el ensayo con un fotorreactor para el tratamiento de aire por fotocatálisis, se han seguido los siguientes objetivos parciales para su logro:

1. Optimización de una metodología para la toma de muestras de microorganismos en aire.
2. Puesta a punto de un protocolo para el análisis e identificación de muestras de bacterias y hongos combinando técnicas clásicas con moleculares. Adaptación y optimización de las condiciones experimentales de las diferentes técnicas utilizadas para muestras ambientales procedentes del aire.
3. Estudio de la capacidad de colección de bacterias y hongos de varios muestreadores por impacto en placa, de alto caudal, y de una sola etapa, así como de otras metodologías de muestreo pasivas o activas.
4. Caracterización de hongos y bacterias de aire interior en diferentes tipos de edificios, localizaciones geográficas y estaciones del año.
5. Estudio de la eficiencia de un reactor tubular a escala de laboratorio para el tratamiento fotocatalítico de hongos y bacterias de aire interior.
6. Optimización de las condiciones de ensayo con un reactor a escala de laboratorio y comparación de estudios fotolíticos y fotocatalíticos con lámparas de UV-A y UV-C de diferentes potencias.
7. Determinación de la vida fotocatalítica del reactor tubular durante un periodo de dos años.
8. Diseño, desarrollo y puesta a punto de un reactor a escala de demostración para el tratamiento fotolítico, mediante lámparas de UV-C y fotocatalítico, con lámparas de UV-A y UV-C y un catalizador basado en TiO_2 .

9. Puesta a punto de las condiciones de muestreo y ensayo con el reactor a escala de demostración. Estudio de la eficiencia para la eliminación de hongos y bacterias en aire interior de un despacho, variando el número de lámparas y la duración de los tratamientos.

3. METODOLOGÍA

3.1. MEDIOS DE CULTIVO

Para el cultivo de las cepas de bacterias y hongos muestreadas en aire, se utilizaron los siguientes medios:

3.1.1. Medios para el crecimiento de bacterias

- **Agar nutritivo (AN):**

Extracto de carne: 3g	Agar: 15g
Peptona bacteriológica: 10g	Agua destilada: 1L
NaCl: 5g	pH: 7.2-7.4

Una vez disueltos los diferentes componentes el medio se esteriliza 15 minutos en autoclave a 1 atmósfera de presión y 120°C. Es un medio utilizado para el cultivo de microorganismos que no sean muy exigentes en sus requerimientos nutricionales.

- **Luria-Bertanii (LB):**

Bactotripton: 10g	Agar: 15g
Extracto de levadura: 5g	Agua destilada: 1L
NaCl: 5g	pH: 7.2-7.4

Se esteriliza 15 minutos en autoclave a 1 atmósfera de presión y 120°C. Es un medio general para el crecimiento de bacterias. A los preparados de LB líquido no se les añadió agar.

- **Luria-Bertanii (LB)-ampicilina:**

Medio LB suplementado con el antibiótico ampicilina 0.1mg/L.

- **Medio Agar Envirocount TSA Neutralizing (Laboratorios Microkit®):**

Digerido pancreático de caseína: 5g	Polisorbato 80: 5g
Extracto de levadura: 2.5g	Lecitina: 7g
Dextrosa: 10g	Púrpura de Bromocresol: 0.02g
$C_2H_3NaO_2S$: 1g	Agar bacteriológico: 15g
Na_2SO_3 : 6g	Agua destilada: 1L
$NaHSO_3$: 2.5g	

Medio de cultivo para recuento de bacterias aeróbicas, con neutralizante para anular la presencia de desinfectantes en el aire y emulsificantes y dispersantes, que neutralizan la desecación de la placa durante el muestreo. El púrpura de bromocresol es un indicador de pH que vira a color amarillo en presencia de bacterias fermentadoras.

3.1.2. Medios para el crecimiento de hongos

- **Agar extracto de malta (AEM) (Hispanlab, Pronadisa®):**

Extracto de malta: 20g
Agar: 20g

Agua destilada: 1L
pH: 5.6

Se esteriliza 15 minutos en autoclave a 1 atmósfera de presión y 120°C. Este medio se emplea para el cultivo y aislamiento de hongos. Es válido para la mayoría de especies, permitiéndolas esporular y adquirir un crecimiento típico.

- **Agar extracto de malta glucosado (Raper y col., 1949) (Pronadisa®):**

Extracto de malta: 20g
Glucosa: 1g
Agar: 20g

Agua destilada: 1L
pH: 5.6±2

Se esteriliza 15 minutos en autoclave a 1 atmósfera de presión y 120°C. Este medio se emplea para el cultivo y aislamiento de hongos.

- **Agar dextrosa Sabouraud + cloranfenicol (AS) (Hispanlab, Pronadisa®):**

Preparado comercial, con la siguiente composición:

Dextrosa: 40g
Mezcla de peptonas: 10g
Cloranfenicol: 0.05g

Agar: 15g
pH: 5.62

Se disuelven 65g del preparado en 1L de agua destilada. Se calienta con agitación y se hierve durante 1 minuto. Se esteriliza en autoclave a 1 atmósfera de presión y 120°C. Se emplea para el cultivo y aislamiento de hongos. El antibiótico Cloranfenicol impide el crecimiento de bacterias.

- **Agar extracto de levadura Czapek (Raper y col., 1949):**

K₂HPO₄: 1g
Extracto de levadura: 5g
Sacarosa: 30g

Agar: 20g
Elementos traza: 10ml
Agua destilada: 890ml

Para evitar la precipitación de los fosfatos y la caramelización del azúcar, el fosfato de potasio se disuelve separadamente en 100ml de agua destilada y se autoclava 15 min a 120°C y 1 atmósfera de presión. Los otros constituyentes se disuelven separadamente en 890ml de agua destilada. La solución se autoclava por el mismo tiempo a la misma temperatura. Después de la esterilización, las 2 porciones se mezclan asépticamente, cuando todavía están calientes.

Elementos traza (concentrado de los componentes minerales, excepto el fosfato):

NaNO ₃ : 300g	FeSO ₄ .7H ₂ O: 1g
MgSO ₄ .7H ₂ O: 50g	Agua destilada: 10ml
KCl: 50g	

- **Agar corn meal (Difco®):**

Bacto-corn meal agar: 17g	pH: 6.0
Agua Destilada: 1L	

Se calienta hasta hervir para disolverlo completamente y posteriormente se autoclava 15 minutos a 120°C. Es un medio pobre en sustancias nutritivas.

- **Potato dextrose agar (PDA) (Oxoid®):**

Potato dextrose agar: 39g
Agua destilada: 1L

Se calienta hasta hervir para disolverlo completamente y posteriormente se autoclava 15 minutos a 120°C. Se emplea para el cultivo de hongos.

- **Potato dextrose broth (Difco®)**

Extracto de patata: 4g	pH: 5.1 +/- 0.2
Dextrosa: 20g	
Agua destilada: 1L	

Se calienta hasta hervir para disolverlo completamente y posteriormente se autoclava 15 minutos a 120°C. Se emplea para el cultivo de hongos.

- **Yeast Peptone Dextrose (YPD):**

Extracto de levadura: 10g	Agua destilada: 1L
Bacto peptona: 20g	
Dextrosa: 20g	

Se calienta hasta hervir para disolverlo completamente y posteriormente autoclava 15 minutos a 120°C. Se emplea para el cultivo de levaduras.

- **Agar yeast peptone dextrose (AYPD):**

Extracto de levadura: 10g	Agar: 20g
Bacto peptona: 20g	Agua destilada: 1L
Dextrosa: 20g	

Se calienta hasta hervir para disolverlo completamente y posteriormente se autoclava 15 minutos a 120°C. Se emplea para el cultivo de levaduras.

3.2. SOLUCIONES, TAMPONES, ADITIVOS

- **Tampón sodio fosfato (PBS):**

NaCl: 130mM

Na₂PO₄ / NaH₂PO₄: 10mM

pH: 7.2-7.4

- **Tampón sodio fosfato Tween (PBSt):**

Para su preparación se añaden 3µl del detergente Tween 20 (Sigma) a 1 litro de PBS estéril.

- **Tampón TBE 0.5x**

Tris 100mM

H₃BO₃ 100mM

EDTA 0.2mM

pH: 8

- **Tampón TAE 1X**

Tris-acetato 40mM

EDTA 1 mM

pH: 8

3.3. MÉTODOS DE TOMA DE MUESTRA DE AIRE

3.3.1. Métodos ensayados para la puesta a punto de una metodología de toma de muestra de aire

- **Decantación gravitatoria**

Para el muestreo de hongos y bacterias cultivables se depositaron placas Petri abiertas con los diferentes medios de cultivo, o solución isotónica, en los distintos puntos de muestreo.

- **Muestreo por impacto en filtro**

Con el objetivo de recolectar también bacterias no cultivables en los medios o condiciones de cultivo empleados se utilizaron filtros de 0.22 micrómetros (EMD Millipore Corporation®, Merck) que se incorporaron, humedecidos previamente en tampón PBS estéril, en un embudo perforado como portafiltro. Se muestreó durante 40 minutos en los distintos puntos de muestreo, incorporando el portafiltro a una bomba de succión.

3.3.2. Muestreadores de aire

A lo largo del presente trabajo se emplearon cuatro impactadores diferentes de una sola etapa, multiorificio, para su comparación y selección del más adecuado en función del

tipo de ensayo realizado. Estos muestreadores están diseñados para la recolección de microorganismos vivos, capaces de crecer en medio de cultivo. Dos o tres días antes de cada ensayo, se realizó una prueba muestreando diferentes volúmenes de aire, de esta forma, la cantidad de aire a muestrear se seleccionó en función de la contaminación microbiológica esperada evitando así la saturación de las placas. Una vez efectuados los muestreos, las placas Petri se incubaron y posteriormente se llevó a cabo un conteo de unidades formadoras de colonia (UFC). Los resultados se expresaron en forma de UFC por volumen de aire muestreado (UFC/m^3). Al inicio de cada muestreo los cabezales se esterilizaron con etanol al 70%.

- **DUO SAS SUPER 360 (VWR, International PBI Srl.)**

La norma UNE 171330-2 utiliza este instrumento como un ejemplo de método de monitorización microbiológica del aire (UNE 171330-2, 2009b). El modelo SAS utilizado consta de 2 cabezales independientes y una sola bomba de aspiración que trabaja con un flujo de 360L/min, proporcionando un flujo de aire de 180L/min por cada cabezal. Estos cabezales pueden trabajar independientemente o juntos. El doble cabezal permite realizar duplicados o muestrear dos tipos diferentes de microorganismos al mismo tiempo (figura 3.1).



Figura 3.1. Muestreador DUO SAS SUPER 360

- **SPIN AIR V2 (IUL s.a.)**

Este muestreador consta de un solo cabezal, pero puede trabajar mediante conexión por cable con otro muestreador esclavo. Cada muestreador tiene su propia bomba. El muestreador esclavo no dispone de botones y se controla directamente a través del muestreador master, que contiene el microprocesador y conexión a la red eléctrica. Los cabezales de los muestreadores, tienen la capacidad de rotar a diferentes velocidades. Cuando se activa la rotación, se puede obtener un recuento para el que no son necesarias las posteriores correcciones.



Figura 3.2. Muestreador SPIN AIR V2, master conectado a su esclavo.

El dispositivo del que dispone este equipo combina el movimiento rotatorio con la distribución especial de los agujeros para cubrir el 100% de la superficie del agar. Se realizaron experimentos con rotación y sin ella, a modo de comparación (figura 3.2).

Para el cálculo de los valores de UFC corregidos (placa sin rotación), se han utilizado las tablas de correcciones estadísticas que proporciona el manual de los muestreadores.

- **SAMPL'AIR (AES Chemunex, BioMérieux co.)**



Este tipo de muestreador contiene un solo cabezal. Su funcionamiento está validado de acuerdo con la norma ISO0020 14698-1 de la Agencia de protección de la Salud (HPA, UK) (ISO 14698-1, 2003) (figura 3.3).

Figura 3.3. Impactador SAMPL'AIR

- **BIOSTAGE 200 (SKC Inc.)**



Figura 3.4. Impactador BioStage 200 conectado a la bomba BioLite.

A diferencia del resto de muestreadores de aire, la placa perforada (BioStage 200) es independiente y para su uso debe acoplarse a una bomba a través de un tubo flexible de plástico (figura 3.4). Para los ensayos se empleó la bomba de rotor con paletas de grafito (BioLite Air Sampling Pump, SKC Inc., modelo 1532-101-6557x). Para el ajuste del caudal a 14.15 L/min se utilizó un rotámetro de 30L/min (ABB, Fischer Porter®). A diferencia del resto de cabezales, contiene un cono de aluminio en la entrada de aire. Es equivalente al Andersen N-6 y el Aerotech 6.

Para las correcciones de UFC nos basamos en el trabajo de Macher (Macher, 1989). A continuación se describen las principales características de los muestreadores empleados en este trabajo:

	DUO SAS SUPER 360	SPIN AIR	S'AMPLAIR	BIOSTAGE 200
Número de cabezales	2	1+1	1	1
Flujo de aire (L/min)	360 (180 por cabezal)	100/Placas Petri 60/Placas Rodac	100	14.15
Volúmen máximo (L)	1999	9999	50-10000	Sin límite
Velocidad de rotación de la placa (rpm)	0	0,1,2,3,4	0	0
Autonomía (h)	7	8 (sin esclavo)	4	Sin límite
Peso (kg)	1.75	1.7 Master 1.3 Esclavo	1.8	6.05 (bomba)
Número de orificios	219	400	256	200
d50* (µm)	1	0.88	0.5	0.6
Diámetro de los orificios (mm)	1	0.7	0.7	0.25

Tabla 3. 1. Cuadro resumen de las características de los muestreadores de aire utilizados.

*Se define el d50 como el diámetro de partículas que son colectadas con un 50% de eficiencia (Macher, 1989)



Figura 3.5. Placas perforadas de los muestreadores SPIN AIR, DUO SAS SUPER 360 y BIOSTAGE 200, respectivamente.

• ENSAYOS DE COMPARACIÓN DE MUESTREADORES

En un laboratorio de 46m², se ha evaluado las diferencias en funcionamiento y capacidad de recogida de bacterias de los muestreadores DUO SAS SUPER 360, SPIN AIR V2 Y SAMPL'AIR. Los ensayos se realizaron durante la actividad normal de 5 trabajadores, comenzando a las 12 de la mañana. Para evitar la interferencia de corrientes de aire, se cerraron puertas y ventanas y se apagó el sistema de aire acondicionado y calefacción. Los muestreadores se colocaron en una encimera del laboratorio, a una altura de 1.4 metros del suelo, de tal manera que quedaban en la zona de respiración de los ocupantes en posición sentada. Se situaron en línea recta, con una distancia de 0.5m entre ellos para evitar la interferencia entre los flujos de aire de cada uno. Como medio de cultivo se utilizó Agar nutritivo. Durante la toma de muestras, se midió temperatura y humedad relativa (HR) de forma continuada. Las muestras se tomaron por triplicado y en las tres posiciones posibles de la mesa, derecha-centro-izquierda, con cada muestreador. Se recogieron por tanto un total de 9 muestras por cada cabezal.

Se realizaron pruebas previas en días anteriores para fijar el volumen de muestreo, de tal manera que se evitara la saturación de las placas o que hubiera un mínimo número de colonias, susceptible de ser evaluado. Se seleccionó un volumen de 550L de aire en cada repetición. Los muestreadores SAS, recogen la muestra en 3.05 minutos (180L/min) y los muestreadores SAMPL'AIR y SPIN AIR en 5.5 minutos (100L/min)

El cálculo de la velocidad del aire al entrar por el cabezal de los muestreadores (velocidad de impacto) se calculó mediante la siguiente fórmula (Yao y col., 2006a):

$$V = \frac{4.F}{N.\pi.D^2} \quad \text{Ec. 3.1}$$

Donde F es el caudal en m³/seg, N es el número de agujeros y D el diámetro de los orificios.

Por otro lado, Zhen y colaboradores calcularon el factor de desecación del impactador mediante la ecuación 3.2. (Zhen y col., 2009) :

$$\text{Desecación} = \frac{F}{S} \quad \text{Ec. 3.2}$$

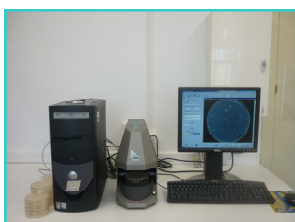
Donde F es el caudal del muestreador en m³/seg y S es la superficie de la placa Petri, en este caso 0.006359m² (placas de 90mm).

	DUO SAS SUPER 360	SAMPL'AIR	SPIN AIR
Velocidad del aire (m/seg)	17.4	16.95	10.85
Factor de Desecación	0.47	0.26	0.26

Tabla 3.2. Características específicas de los impactadores en placa DUO SAS SUPER 360, SAMPL'AIR y SPIN AIR.

3.3.3. Conteo de unidades formadoras de colonia y correcciones realizadas tras el uso de muestreadores por impacto en placa

El conteo de UFC se ha realizado de forma manual o utilizando el contador de colonias automático Flash and Grow (IUL s.a.) que funciona conectado a un ordenador que controla su funcionamiento. El software Flash and Grow 1.2 (IUL s.a.) captura y procesa las imágenes de las placas. Al número obtenido, debe aplicársele una corrección ("Positive hole correction"), basada en la teoría de que a medida que aumenta el número de partículas que impactan en la placa Petri, aumenta la probabilidad de que una partícula impacte en el mismo lugar que otra anterior (Andersen, 1958).



El número de colonias tras la corrección (n_c) para un impactador con h orificios, puede calcularse mediante la ecuación 3.3 (Macher, 1989; Hinds, 1999).

Figura 3.6. Contador de colonias automático

$$n_c = n_f \left(\frac{1.075}{1.052 - f} \right)^{0.483} \quad \text{para } f < 0.95 \quad \text{Ec. 3.3}$$

Donde $f = n_f/h$.

n_f = número de colonias en la placa.

La cantidad de microorganismos en el aire, expresado en UFC/m³, se calculó utilizando la Ecuación 3.4:

$$UFC / m^3 = \frac{n_c}{F \cdot t} \quad \text{Ec. 3.4}$$

Dónde F es la velocidad de flujo y t el tiempo de muestreo para cada muestreador.

3.3.4. Aplicación de la norma UNE 171330-2:2009 para el cálculo del número de puntos de muestreos

Para el cálculo del número mínimo de puntos de muestreo, esta norma tiene en cuenta la superficie total construida del edificio y utiliza la siguiente fórmula:

$$\boxed{\text{Puntos de Muestreo} = 0,15 \cdot \sqrt{\text{Superficie (m}^2\text{)}}} \quad \text{Ec.3.5.}$$

Para evaluar la posible peligrosidad de los niveles de UFC/m³ de hongos y bacterias, se han seguido las siguientes recomendaciones donde los límites se establecen en función de la relación interior/exterior:

Relación interior/exterior	BACTERIAS	HONGOS
Exterior	1	1
Interior: en área ocupada	< 1,75	< 0,75

Tabla 3.3. Relación de UFC/m³ interiores y exteriores a partir de los cuales se recomienda tomar medidas correctoras según la norma (UNE 171330-2, 2009a).

Esta norma establece un valor de 1 para el exterior, por lo que para respetarla, la concentración de hongos debe ser menor en el interior que en el exterior. Sin embargo, en el caso de bacterias se acepta que la concentración sea ligeramente superior en el interior debido a la aportación de las personas que ocupan los espacios muestreados.

3.4. CARACTERIZACIÓN DE HONGOS Y BACTERIAS DE AIRE INTERIOR

3.4.1. Cultivo y aislamiento de hongos

Para el muestreo y cultivo de hongos se empleó el medio Agar extracto de malta o Agar Sabouraud. Las muestras recogidas mediante decantación gravitatoria o mediante muestreo activo por impacto en placa, se incubaron a 28°C o 30°C durante 48h, en incubadores (MEMMERT 150 IN). Pasado el tiempo de incubación, se llevó a cabo el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) y se fotografiaron las placas. Se aisló cada colonia de la siguiente manera:

- En el caso de hongos filamentosos, se cortó un pequeño fragmento de cada colonia con ayuda de un bisturí y se colocó en el centro de una placa de 60mm de AEM. Las nuevas placas con las cepas ya aisladas se incubaron a 28°C durante 7 días. En el caso de que se observaran dos o más cepas en una misma placa, se repitió el procedimiento de aislamiento hasta obtener únicamente cultivos puros.
- En el caso de levaduras, se picó cada colonia con un asa de siembra y se sembraron por estría en placas de 60mm de AEM.

3.4.2. Identificación de hongos filamentosos y levaduras por métodos no moleculares



A los 7 y 14 días de incubación, se midió el diámetro de las colonias y se anotaron sus características morfológicas como color, aspecto, textura y bordes. Se llevó a cabo una clasificación inicial en grandes grupos mediante la observación a la lupa a 60-70 aumentos (Olympus SZH10 research stereo microscope y Nikon SMZ800, figura 3.7). Cuando las cepas esporularon, se realizó la observación al microscopio óptico.

Figura 3.7. Lupa Nikon SMZ800

La identificación se llevó a cabo examinando las estructuras reproductoras y las esporas. Para ello se realizaron preparaciones recortando un trocito del borde de cada colonia y depositándolo sobre un portaobjetos. Para utilizar el objetivo de inmersión se colocó un cubreobjetos sobre la muestra aplastando cuidadosamente el agar. Se emplearon los microscopios Olympus Vanox AHMT3 microscope y Olympus BX43 con cámara

fotográfica digital (Color View III de 5 megapíxeles y Olympus SC100 de 10.6 megapíxeles). Para medir las diferentes estructuras se utilizaron los programas cell[^]D (Life science documentation software, Olympus Iberia, S.A.U.) y Stream Start (3D-Imaging and measurements, Olympus Iberia, S.A.U.). La identificación del género y posible especie se llevó a cabo con ayuda de claves taxonómicas (Ellis, 1971; Ellis, 1976; Ramírez, 1982; Samson y col., 2004b). Las muestras se almacenaron a 4°C durante 6 meses o hasta el momento de su procesamiento, en tubos con 10 ml de Agar extracto de malta inclinado (tubos de 30ml de plástico con tapón de rosca, Eurotubo Deltalab). Para ello, se introdujo un fragmento de la colonia en el fondo del tubo con ayuda de un asa de siembra, o se pasó suavemente el asa sobre la colonia, de forma que arrastrara esporas, introduciendo éstas en el tubo. Los tubos se incubaron a 28°C hasta que se observó crecimiento, momento en el que se almacenaron a 4°C.

Para su mejor identificación, algunas de las muestras se sembraron en tres medios diferentes (AEM glucosado, Agar corn meal y Agar extracto de levadura Czapek)(Ramírez, 1982) en placas de 90mm de diámetro. Se añadieron tres fragmentos de una misma colonia en tres puntos diferentes de cada placa, con el objetivo de tener tres réplicas y se dejaron crecer durante 7 y 14 días. De esta forma, cepas muy próximas pueden separarse por el aspecto diferente de sus colonias en los tres medios.



Figura 3.8. Detalle de algunas de las cepas de hongos aisladas en uno de los muestreos realizados.

Para la identificación de levaduras se emplearon Galerías API 20 C AUX (Biomérieux s.a.) y se siguió el protocolo proporcionado por la casa comercial.

3.4.3. Caracterización de bacterias

En función del método de toma de muestra: medio de cultivo, filtro o soluciones isotónicas, se han seguido vías diferentes en el procesamiento de las muestras que confluyen todas en la secuenciación del gen de 16S ARNr completo, o un fragmento del mismo. Este gen forma parte de la maquinaria de síntesis de proteínas, motivo por lo cual es una molécula funcional muy conservada. Sin ser tan grande como el 23S ARNr, su tamaño es suficiente como para ser utilizada como marcador filogenético (figura 3.9). Su secuencia contiene regiones con diferentes grados de conservación, lo que permite no sólo la detección de relaciones filogenéticas próximas (nivel de especie), si no también muy distantes (nivel de *phylum* o dominio). La comparación de secuencias del 16S ARNr proporciona valores de homología estadísticos mucho más precisos que cualquier otra técnica. De este modo, las técnicas de biología molecular nos permiten estudiar la biodiversidad microbiana *in situ* en ecosistemas naturales, sin necesidad de recurrir al aislamiento y cultivo (Amann y col., 1995).

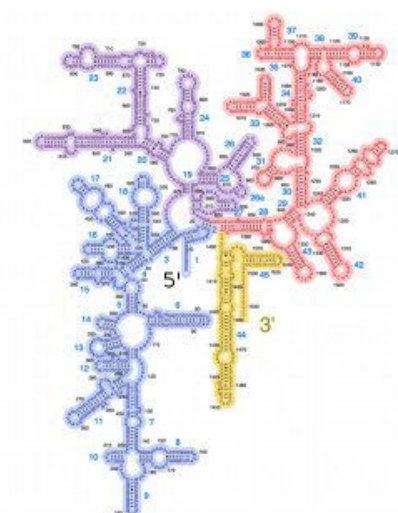


Figura 3. 9. Estructura de la molécula de 16S ARNr (lookfordiagnosis.com, 2009)

3.4.4. Muestras bacterianas recogidas mediante medio de cultivo



Figura 3.10.
Aislamiento por estría en placa

Para el muestreo de bacterias en aire, se utilizaron medios de cultivo generales como el Agar nutritivo y el medio de Luria Bertani. Las muestras recogidas mediante decantación gravitatoria o mediante muestreo activo por impacto en placa, se incubaron a 30°C, para el crecimiento de bacterias ambientales y a 37°C para el crecimiento de posibles bacterias patógenas durante 48h, en cámaras de cultivo o incubadores (MEMMERT 150IN). Una vez incubadas las muestras, se llevó a cabo el conteo de UFC de forma manual o automática y se fotografiaron las placas.

En el caso de que hubiera dos o más colonias en un mismo punto, se aislaron éstas previamente mediante la siembra por agotamiento en otras placas, con el fin de conseguir cultivos puros (figura 3.10).

3.4.5. Muestras bacterianas recogidas mediante filtros

Se llevaron a cabo varios muestreos en los que se aspiró aire sobre filtros con objeto de recolectar posibles bacterias no cultivables en los medios o condiciones de incubación empleados en el presente trabajo. Para la identificación de las bacterias presentes en los mismos, se llevó a cabo una extracción de ADN de los filtros. Para ello, se cortaron en fragmentos, utilizando tijeras estériles, y éstos se introdujeron en tubos Eppendorf a los que se añadió 980µl de tampón PBS estéril. Para la separación de los microorganismos del filtro, se agitaron los tubos en el vórtex durante 5 minutos, se sonicaron 5 minutos, y se volvieron a agitar 5 minutos en el vórtex. A continuación, se extrajeron los fragmentos de los filtros de los tubos y se desecharon. Se centrifugaron los tubos Eppendorf durante 15 minutos a 14000 rpm, a temperatura ambiente, para concentrar la muestra. Se eliminó el sobrenadante y posteriormente se extrajo el ADN, para lo cual se siguió el protocolo del kit: Fast DNA Spin Kit for soil, (Q-BIOgene, MP Biomedicals ©). Para romper las células se utilizó el equipo Fastprep FP120 bead beater (BIO101-Savant, Thermo Savant ©), programado a 5.5 ciclos/seg un número de 6 veces, durante 40 segundos.

Finalizada la extracción, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TBE 0.5x para comprobar la existencia de ADN en las muestras.

- **Tinción con DAPI (4',6- diamidino 2-fenilindol) (Merck KGaA®)**

Se cortó un fragmento de cada filtro empleado en cada muestreo y se tiñó con el colorante universal fluorescente DAPI, que se une específicamente a la doble hélice de ADN y emite a 470nm, para verificar la presencia de bacterias adheridas a su superficie. Los filtros se visualizaron utilizando un microscopio Zeiss Axioskop que lleva acoplado una lámpara de mercurio y dispone de varios filtros de emisión de distintas longitudes de onda (Amann y col., 1990).

- **Test de viabilidad**

Se practicó un test para comprobar la viabilidad de las células en algunos de los fragmentos de filtros en los que se había muestreado. Se tiñeron con el colorante fluorescente verde SYTO 9 y el colorante fluorescente rojo propidium iodide que tiñen ácidos nucleicos (Live/Dead BacLight Bacterial Viability kit, Molecular Probes, Inc). Las muestras se visualizaron al microscopio de fluorescencia utilizando un filtro para fluorescencia azul. Las células vivas se visualizaron en color verde mientras que las muertas se veían teñidas de rojo.

3.4.6. Muestras bacterianas recogidas mediante solución isotónica o PBS

Se introdujo la muestra resuspendida en tampón PBS en un tubo Eppendorf y se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 minutos con el fin de sedimentar las células. Se retiró prácticamente todo el sobrenadante de los mismos, dejando alrededor de 50 µl de PBS. Se resuspendieron entonces las células mediante agitación en el vórtex. Posteriormente se llevó a cabo una amplificación del ADN genómico.

- **Amplificación de ADN genómico**

Para la amplificación del ADN genómico de muestras con poca cantidad del mismo, como las aisladas por decantación gravitatoria sobre la solución isotónica PBS, se siguió el protocolo y se utilizaron la enzima, cebadores y tampones proporcionados por el kit GenomiPhi (Amersham Biosciences, corp).

Previo al inicio del protocolo, para debilitar las paredes celulares bacterianas y facilitar el acceso al material genético, las muestras se sometieron a varios ciclos de calentamiento y enfriamientos bruscos, que se realizaron en la máquina de PCR, programada con la siguiente secuencia:

94°C (5min)- 4°C (1min)- 94°C (1min)- 4°C (1min)- 94°C (3min)- 4°C (5min)

3.4.7. Extracción de ADN de hongos filamentosos y levaduras. Caracterización de hongos por métodos moleculares

Algunas de las colonias aisladas en los muestreos se sembraron en medio PDA y se incubaron a 28°C durante 15 días. Pasado ese tiempo se llevó a cabo una extracción de ADN

de un fragmento de cada colonia, con el micelio crecido, siguiendo el protocolo del kit Power Soil DNA Isolation kit (MOBIO Laboratories, Inc.).

En el caso de levaduras, se llevó a cabo el cultivo en medio YPD a 28°C con agitación, durante 7 días. Posteriormente, se añadió 1.8ml de cada cultivo en tubos de colección de 2 ml y se siguió el protocolo del kit UltraClean Microbial DNA Isolation kit (MOBIO Laboratories, Inc.).

Una vez eluído el ADN, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TBE 0.5x para comprobar la existencia de ADN.

Para la identificación de hongos se amplificó un fragmento de unos 600 pares de bases de ADN ribosómico que abarca las regiones intergénicas ITS1 e ITS2 (Internal Transcribed Spacer) y el gen ribosómico 5,8S (figura 3.11). Los genes ribosómicos están presentes en el genoma en gran número de copias y sus secuencias están altamente conservadas, sin embargo, las regiones ITS, son más variables y en ellas se acumulan mayor número de mutaciones pudiéndose realizar estudios filogenéticos sobre ellas (Sánchez-Ballesteros, 2001).

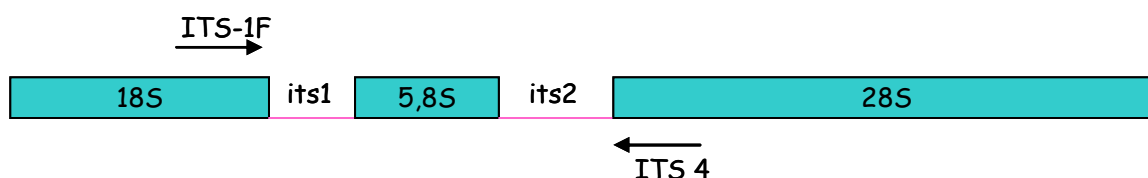


Figura 3.11. Fragmento amplificado para la identificación de hongos, mediante los cebadores ITS-1F e ITS 4.

3.4.8. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

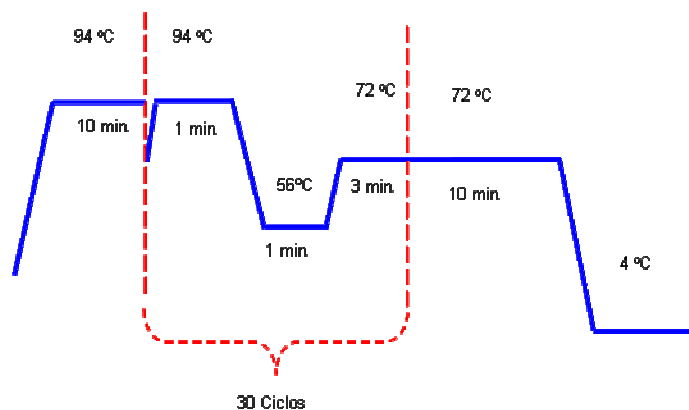
La PCR es un método rápido y versátil de amplificación *in vitro* de secuencias específicas de ADN (Mullis y col., 1986).

Habitualmente, la reacción se diseña para permitir la amplificación selectiva de una o varias secuencias dianas de ADN presentes en una mezcla compleja de secuencias (ADN total). Utiliza como cebadores dos oligonucleótidos complementarios (primers) a lo que serán los dos extremos del producto y colocados con sus terminales 3'OH enfrentados. Lo que se amplifica es el ADN comprendido entre ambos oligos. Estos cebadores están diseñados para que se pueda iniciar la reacción de síntesis de ADN en presencia de una ADN polimerasa termoestable adecuada y de los precursores del ADN (dNTPs: los cuatro desoxinucleótidos trifosfato: dATP, dCTP, dGTP y dTTP). La sucesión de una serie de ciclos en los que tiene lugar la desnaturalización del molde, hibridación con los cebadores y extensión de la síntesis por acción de la ADN polimerasa, origina una acumulación exponencial de fragmentos específicos. Cada cebador inicia la síntesis de una hebra de ADN complementaria a una de las hebras del segmento de la diana y las dos hebras de nueva síntesis serán complementarias entre sí. Las hebras de ADN de nueva síntesis servirán de moldes para las reacciones de síntesis en los ciclos posteriores (Izquierdo, 2001). El ADN amplificado por PCR, es utilizado posteriormente como material de partida en las técnicas de clonaje y DGGE (Stahl y col., 1991). Una vez amplificado el gen diana, se secuencia para su posterior identificación.

Las amplificaciones del gen 16S ARNr de bacterias se llevaron a cabo en un Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems, Life Technologies ©).

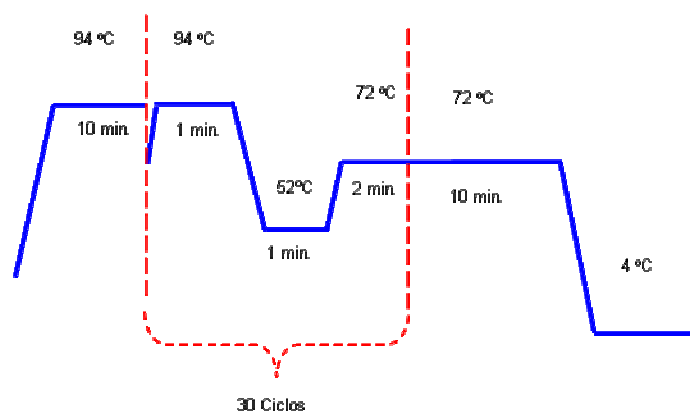
Para la identificación de bacterias se amplificó el gen 16S ARNr utilizando los cebadores 27F y 1492R, que amplifican un fragmento de 1465 pares de bases (pb) de longitud (tabla 3.4). Los cebadores 27F-1492R, se utilizaron en las reacciones de amplificación en las que se partía de colonias aisladas de placas con las que se había muestreado o de ADN extraído de filtros para la posterior clonación del gen. Se tomó cada colonia y se resuspendió en 100 μ l de agua destilada estéril. Se calentaron las muestras a 100°C durante 3 minutos con el objetivo de debilitar las células.

Para la reacción se utilizaron la enzima Taq polimerasa de *Thermus aquaticus* BM, recombinante (*E. coli*) y el tampón de reacción y cloruro de magnesio de la casa Roche (Perkin Elmer). La mezcla de reacción contenía 3 μ l de la suspensión bacteriana, 1x tampón de reacción, dNTPs 1mM (Amersham biosciences), $MgCl_2$ 2.5mM, 0.5mM de cada uno de los cebadores 27F y 1492R (Isogen) y 0.025 u/ μ l de Taq ADN Polimerasa en un volumen final de 100 μ l. El programa de temperaturas utilizado fue el siguiente:

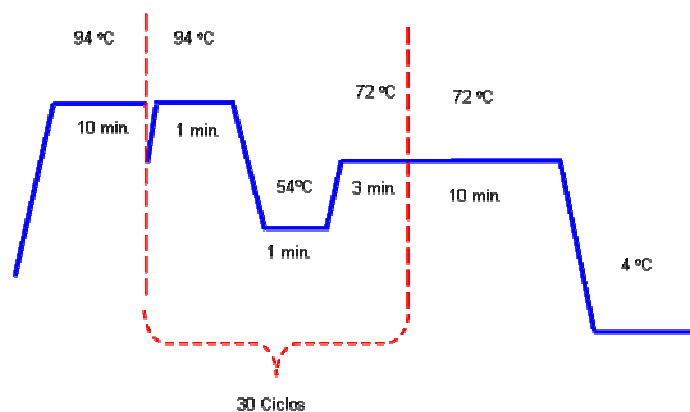


Los cebadores 341F(GC)-907R se utilizaron en las reacciones de amplificación previas a la separación de los fragmentos del gen 16S ARNr por DGGE. Estos cebadores amplifican parcialmente este gen, originando un fragmento de 566pb. El cebador 341F(GC) añade una cola de guanina-citosina en el extremo del fragmento amplificado (abrazadera GC), siendo éste un dominio de alta temperatura de fusión. Al migrar en el gel con gradiente desnaturante, esta cola se abre formando una horquilla que retarda la migración de los diferentes fragmentos en el gel. Para la reamplificación de bandas de DGGE, se utilizaron los cebadores 341F y 907R. La mezcla de reacción fue la misma que la utilizada para amplificar el gen completo, pero en un volumen final de 50 μ l.

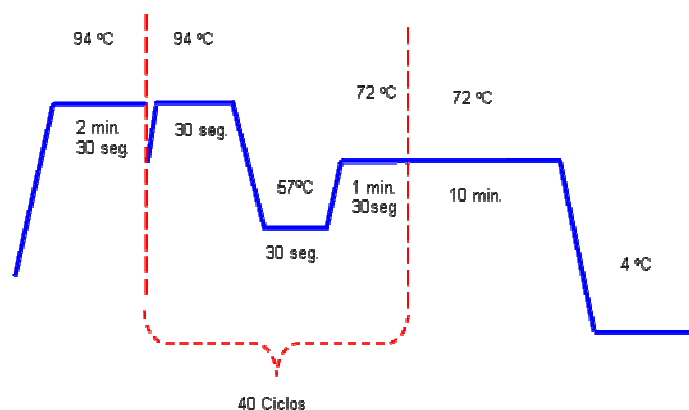
El programa de temperaturas utilizado con los cebadores 341F-907R o 341F (GC)-907R fue el siguiente:



Los cebadores M13F y M13R (Invitrogen) (tabla 3.4) se emplearon durante el desarrollo del protocolo de clonación cuando se quiso amplificar el gen ribosomal inserto en el vector. La mezcla de reacción consistió en: 3µl de ADN, 1x tampón de reacción, dNTPs 0.5mM, $MgCl_2$ 2.5 mM, 1mM de cada uno de los cebadores y 0.025 u/µl de Taq ADN Polimerasa. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:



En las muestras de hongos se emplearon los cebadores ITS-1F e ITS-4 para amplificar un fragmento de aproximadamente 600pb (tabla 3.4), consistiendo la mezcla de reacción en: 5µl de ADN, 1x tampón de reacción, dNTPs 1mM, $MgCl_2$ 3mM, DMSO (2.5 µl), Tween 20 al 5%, 1 mM de cada uno de los cebadores y 0.025 u/µl de Taq ADN Polimerasa en un volumen final de 50 µl. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:



En la siguiente tabla se muestran los cebadores empleados en este estudio, así como las secuencias de los fragmentos amplificados, tanto para hongos como para bacterias:

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Referencia
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG ^a	[1]
1492R	TACGGYTACCTTGTACGACTT ^a	[1]
341F (GC) ^b	CCTACGGGAGGCAGCAG	[2]
341F	CCTACGGGAGGCAGCAG	[2]
907R	CCGTCAATTCNTTTGAGTTT ^a	[2]
M13F	GTAAAACGACGGCCAG	[3]
M13R	CAGGAAACAGTATGAC	[3]
ITS-1F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	[4]
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	[5]

Tabla 3. 4. Cebadores utilizados para la amplificación del gen 16S ARNr. Las letras F (forward) y R (reverse) indican la orientación del cebador con respecto al ARNr.

a: (M: C/A; N :A/C/ G/T; Y: C/T)

b: (Secuencia de 40 nucleótidos en el extremo 5' del cebador (abrazadera GC): 5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCC CCG CCC CCG CCC-3')

[1](Lane, 1991), [2] (Muyzer y col., 1996), [3] "TOPO Cloning Kit" (Invitrogen Corporation), [4] (Gardes y col., 1993), [5] (White y col., 1990).

3.4.9. Electroforesis en gel de agarosa

Los resultados de las amplificaciones se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TBE 0.5x. Los geles se tiñeron con una solución con Bromuro de Etidio (10µr/ml).

3.4.10. Corte con Enzimas de Restricción

Con el objetivo de disminuir el número de secuenciaciones, se llevó a cabo el corte con enzimas de restricción (endonucleasas que reconocen dianas específicas en el ADN) del gen 16S ARNr amplificado en las muestras. De esta forma se produjeron varios fragmentos de ADN de distintos tamaños que pudieron separarse en una electroforesis con gel de agarosa al 1.5-2 %. Cada especie presentó un patrón de bandas diferente por lo que mediante la comparación de los patrones se pudo diferenciar que especies no habían sido aisladas con anterioridad.

Se utilizaron las enzimas Sau3AI o BfuCI (New England Biolabs) que cortan el ADN en la misma secuencia y se siguieron las indicaciones proporcionadas por la casa comercial. Los puntos de corte de ambas enzimas son:



3.4.11. Purificación de productos de PCR

Los productos de PCR se purificaron siguiendo el protocolo del kit JetQuick Spin Column technique (Genomed GmbH).

3.4.12. Medida de la concentración de ADN

Se midió la concentración de ADN de las muestras en un NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc.).

3.4.13. DGGE (Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante)

La DGGE tiene como propósito separar una mezcla de secuencias de ADN de un gen amplificado (de entre 300 - 1000 pb), correspondientes a unidades taxonómicas diferentes, basándose en la diferencia entre sus temperaturas de fusión (temperatura de "melting", T_m). Tenemos mezclas de ADN complejas cuando hemos recolectado los microorganismos utilizando filtros o soluciones. Los ADNs se extraen y se amplifica el gen diana de cada microorganismo añadiéndole en uno de sus extremos una secuencia rica en los nucleótidos G y C (abrazadera GC). La DGGE es uno de los sistemas más eficaces para la detección de mutaciones, ya que es capaz de separar moléculas de ADN que se diferencian en un solo nucleótido (Myers y col., 1987). Las muestras de ADN se separan electroforéticamente a través de un gel de acrilamida / bisacrilamida, con un gradiente creciente de urea - formamida, a temperatura constante. Las moléculas de ADN migran hacia el polo positivo y se desnaturalizan en una zona determinada del gel, en función de la concentración de urea-formamida. Se obtiene así un espectro de bandas en el gel en el que cada banda contiene teóricamente una secuencia de ADN diferente. Esta técnica es útil para realizar estudios de variación de poblaciones de microorganismos en el espacio o en el tiempo, así como para analizar la influencia de determinados factores nutricionales o ambientales sobre un ecosistema (Muyzer y col., 1996). Una vez separadas las unidades taxonómicas, se vuelve a amplificar el gen diana correspondiente a cada banda del gel y se secuencian para su posterior identificación.

Se utilizó el sistema D-Code Universal system (Bio-Rad) con tampón TAE 1x. Se prepararon geles al 6% de poliacrilamida con un gradiente desnaturizante del 30 al 60 % de urea-formamida (37.5:1 acrilamida:bisacrilamida) (Muyzer y col., 1993). La electroforesis se llevó a cabo a 100V durante 12h a 60°C (figura 3.12). Una vez finalizada la electroforesis, los geles se tiñeron con una solución de Bromuro de Etidio (10µg/ml) y las bandas se detectaron utilizando un transiluminador UV, se cortaron y se añadieron en 100µl de agua destilada. Se dejaron a 4°C durante 2 días para favorecer la elución del ADN. Posteriormente se reamplificaron, con los cebadores 341F-907R, para secuenciarse de la manera descrita en el apartado 3.6.4.

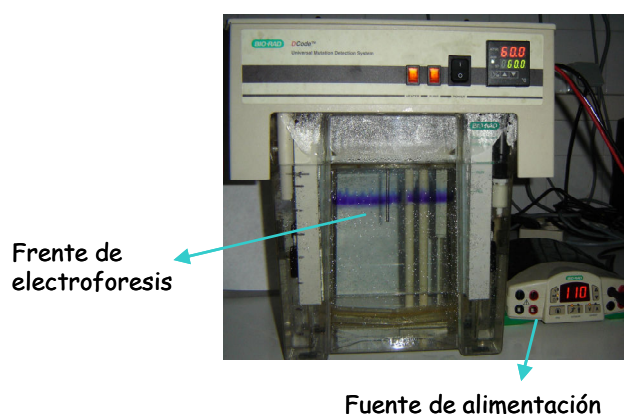


Figura 3. 12. Cubeta de electroforesis con el gel con gradiente desnaturizante de urea-formamida en su interior

3.4.14 Clonaje

La clonación de ADN en sistemas celulares requiere la unión *in vitro* de un fragmento de ADN a determinados vectores y la posterior propagación de los híbridos en sistemas celulares adecuados, consta de cuatro etapas:

En la ligación (1), el fragmento de ADN amplificado (producto de PCR) se une *in vitro* a un vector determinado. Posteriormente en la transformación (2) se transfiere el vector, el cual contiene el fragmento de ADN insertado, a células competentes. La propagación (3) es selectiva y finalmente se aíslan (4) y extraen los clones que contienen el ADN, para su posterior secuenciación e identificación. Esta técnica permite estudiar la diversidad microbiana de ecosistemas naturales, separando las secuencias procedentes de mezclas complejas de ADN, como las correspondientes a filtros o soluciones. Permite realizar estudios filogenéticos más precisos que con otras técnicas, debido a que los fragmentos a insertar pueden ser relativamente grandes (normalmente el gen completo del 16S ARNr)(Ward, 1990) .

Los fragmentos de ADN amplificados mediante PCR, con los cebadores 27F y 1492R como se indica en el apartado 3.6.4., fueron ligados al vector 2.1 TOPO utilizando el " *TOPO Cloning Kit*" (Invitrogen Corporation). Para ello, se siguieron las recomendaciones de la casa comercial.

Las colonias blancas se replicaron en una "placa maestra" con medio LB-ampicilina, con el objetivo de confirmar la presencia del inserto. Cada colonia blanca aislada se sembró en medio LB, incubándose en agitación a 37°C durante 12 horas. Los clones se conservaron en glicerol (40%) a - 20 °C. Para obtener el plásmido se hizo una extracción siguiendo las instrucciones del kit Wizard Plus SV Minipreps (Promega). Se hirvió la muestra durante 10 minutos y posteriormente se amplificó el gen utilizando los cebadores específicos M13F y M13R de la manera indicada en el apartado 3.6.4.

Los clones obtenidos fueron digeridos con la enzima de restricción EcoRI (BioLabs) tal como se detalla en el manual del fabricante. Las digestiones se visualizaron en gel de agarosa al 1% y los clones se agruparon de acuerdo a sus perfiles de restricción. Finalmente se llevó a cabo la secuenciación de los clones con patrones de restricción diferentes, utilizando los cebadores M13R y M13F.

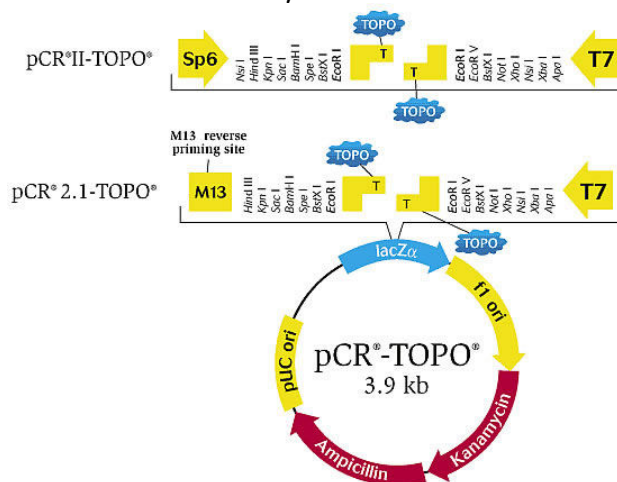


Figura 3. 13. Vector de clonación del gen 16S ("TOPO Cloning Kit",Invitrogen Corporation).

3.4.15. Secuenciación y análisis de secuencias

Los productos de PCR se secuenciaron directamente (Moore y col., 1999) en un secuenciador ABI 377 (Applied Biosystems). Las secuencias procedentes de aislados bacterianos se editaron mediante el programa FinchTV 1.4.0 (Geospiza Inc. 2004-2006).

Las secuencias procedentes de aislados fúngicos se editaron, ensamblaron y alinearon con la ayuda del programa Geneious Pro 4.7.6. Para la construcción de los cladogramas se recurrió al programa PAUP 4.0A125 y se empleó el método de Neighbor-joining (Saitou y col., 1987) aplicando el modelo de distancia Kimura-2, que considera idéntico el patrón de distribución de los 4 nucleótidos (Kimura, 1981) (Swofford, D. L. 2002. PAUP* Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods) Version 4, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts). Los valores de confianza estadística de cada rama se determinaron por análisis de Bootstrap con 1000 réplicas (Felsenstein, 1995) considerándose un índice de Bootstrap significativo por encima del 90%. Los valores de Bootstrap mayores del 50% se muestran en las ramas de los cladogramas.

Las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos GenBank (NCBI, Bethesda, MD, USA)(Benson y col., 2013) utilizando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)(Altschul y col., 1990). El programa BLAST, permite la búsqueda de alineamiento entre secuencias homólogas para identificar el género o especie más próximo. Las secuencias pueden descargarse del GenBank, colección o base de datos de todas las secuencias accesibles al público para su alineamiento (Madigan y col., 2009). En la construcción de los cladogramas de hongos también se emplearon secuencias obtenidas de esta base de datos pertenecientes a especies relacionadas.

3.5. PUNTOS DE MUESTREO DE BIOAEROSOL

A continuación se presenta una descripción de los edificios en los que se realizaron los muestreos de hongos y bacterias en aire que formaron parte de este trabajo, así como los puntos de muestreo tomados en cada uno de ellos.

3.5.1. Biblioteca de la facultad de Psicología de la Universidad Autónoma de Madrid

Se muestreó, por duplicado, mediante placas Petri con los medio de cultivo AN y LB para el crecimiento de bacterias y AEM y AS para el crecimiento de hongos. Junto a ellas se depositaron placas Petri que contenían PBS. Las placas se colocaron sobre una estantería de la biblioteca de Psicología de la UAM, en el campus de Cantoblanco de Madrid, a 2 metros de altura, lejos de la visibilidad de los alumnos y se mantuvieron abiertas durante 23 horas. Las placas con medio de cultivo, se incubaron a 30°C durante 72 horas, tras lo cual se llevó a cabo un conteo de UFC por placa.

3.5.2. Muestreo de hongos y bacterias en cuatro edificios bioclimáticos con diferentes localizaciones geográficas

Se muestreó en cuatro edificios bioclimáticos, diseñados y contruidos gracias al proyecto singular y estratégico, financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación, sobre arquitectura bioclimática y frío solar (ARFRISOL). Se depositaron placas Petri abiertas con los medios de cultivo AN y AEM, por duplicado, en 5 puntos interiores y 2 exteriores

(cara norte y sur de cada edificio) durante 16 horas. En los puntos interiores se muestreó además, mediante aspiración de aire sobre filtros. Las muestras tomadas mediante placas de AN se incubaron durante 48 horas a 30°C y 37°C (apartado 3.4.4). Las placas de AEM se incubaron a 30°C tal y como se describe en el apartado 3.4.1.

- **Edificio localizado en Almería costa**

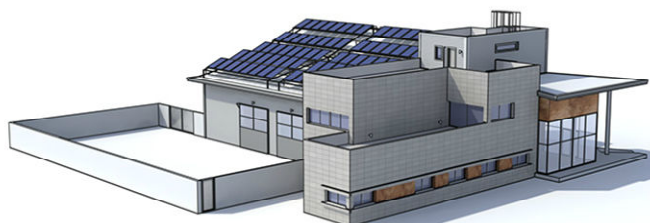


Figura 3. 14. Edificio de Almería costa

Es un edificio de nueva construcción de dos plantas en forma de L, de 1072 m² de superficie localizado en el campus de la Universidad de Almería. El clima allí es mediterráneo-húmedo y en función del mismo se han implementado estrategias bioclimáticas pasivas en el edificio.

- **Edificio localizado en el desierto de Tabernas en Almería**



Figura 3.15. Edificio de Almería desierto

El edificio, de una sola planta en forma de I, tiene una superficie de 1014 m² y se localiza en el desierto de Tabernas, de clima desértico. En su diseño incorpora técnicas solares activas y pasivas, utiliza un sistema radiconvectivo, sombreamientos en fachada y en la cubierta mediante pérgolas, captadores solares y módulos fotovoltaicos.

- **Edificio localizado en Madrid**

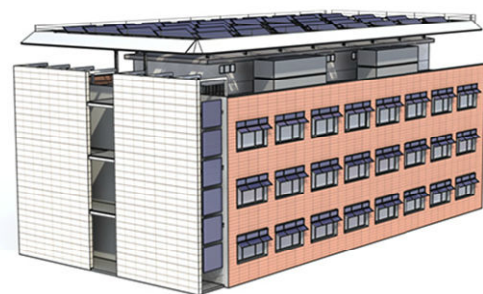


Figura 3.16. Edificio localizado en Madrid.

Edificio situado en el Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT), con clima mediterráneo continental. Constituye una ampliación de un edificio ya existente. Su superficie es de 2047,30m² distribuidos en tres plantas y un sótano. Su fachada de plaqueta cerámica es ventilada, las ventanas poseen vidrios de diferente espesor en función de la orientación y sombreadas en la fachada sur mediante placas solares. En el tejado fue instalada una pérgola en la que se dispusieron colectores solares para obtener energía solar térmica.

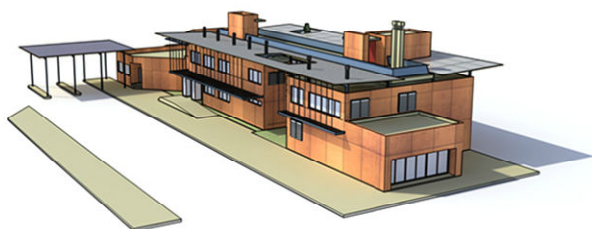
En las diferentes estancias del ED70, se utiliza el sistema de aire acondicionado y calefacción central todo el año, con el que se trata de mantener una temperatura y humedad constante.

Se evita la entrada o salida de contaminantes mediante filtración del aire y además, los laboratorios destinados a investigación se mantienen a diferente presión que el pasillo colindante, para evitar el flujo de contaminantes entre ellos.

- **Edificio localizado en Soria**

Este edificio es una rehabilitación de un edificio ya existente de 1575 m². Se ha convertido la fachada existente en una fachada ventilada, y se le han instalado sombreamientos en la fachada sur y en la cubierta, mediante doble pérgola. También consta de una galería con efecto invernadero. El clima allí es mediterráneo continental.

Figura 3.17. Edificio localizado en Soria



3.5.3. Muestreo estacional y caracterización de hongos y bacterias en dos edificios de diferente edad de Madrid

Se muestreó en dos edificios de diferente edad de la Comunidad de Madrid, pertenecientes al CIEMAT. Uno de los edificios (edificio de Madrid, apartado 3.5.2.), es de reciente construcción (2009), el segundo, es un edificio construido en los años 70. Los muestreos comenzaron en la primavera del 2009 y terminaron en el invierno de 2010. Se hicieron siempre en días consecutivos, comenzando por el edificio más antiguo y se monitoreó temperatura (T) y humedad relativa (HR) en cada punto muestreado. El cálculo del mínimo número de puntos de muestreo se realizó de acuerdo a la norma UNE 171330-2:2009, siendo 7 en el edificio nuevo y 5 en el antiguo (UNE 171330-2, 2009a).

Para los muestreos se utilizaron dos equipos DUO SAS SUPER 360 (apartado 3.3.1.) y se recogieron hongos (con el medio AEM) y bacterias (mediante AN) simultáneamente, por duplicado. Una vez finalizados los muestreos, se incubaron las muestras y se llevó a cabo un conteo de UFC/m³. Las colonias de hongos, además, se aislaron e identificaron tal y como se describe en los apartados 3.4.1 y 3.4.2. Los muestreadores se situaron a 1.5m del suelo aproximadamente.

En el edificio nuevo se tomaron un total de 8 puntos de muestreo interiores, distribuidos de la siguiente manera:

- Sótano: Almacén y baño
- Planta baja: dos despachos
- Primera planta: pasillo
- Segunda planta: dos laboratorios y una sala blanca

En el segundo edificio (edificio antiguo) construido en los años 70, se tomaron 10 puntos de muestreo:

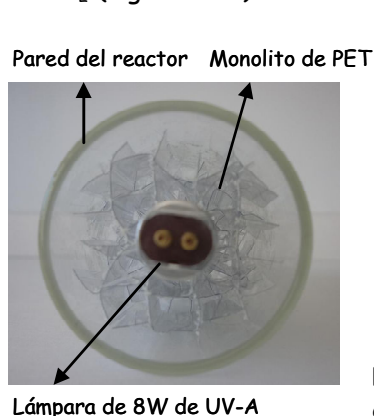
- Sótano: En un despacho, un laboratorio y un pasillo
- Planta baja: En un despacho, un pasillo y una biblioteca
- Planta primera: En un despacho, un cuarto de baño, un laboratorio y un pasillo.

Además se tomó muestra también de dos puntos exteriores situados en la cara norte y sur de cada edificio.

3.6. TRATAMIENTO FOTOCATALÍTICO DE AIRE INTERIOR

3.6.1. Reactor fotocatalítico tubular a escala de laboratorio

Los primeros tests fotocatalíticos se llevaron a cabo en un reactor tubular fabricado en vidrio borosilicato con flujo continuo descendente (Portela, 2009; Sánchez y col., 2009). Este reactor se conectó a una bomba de aspiración (Biolite) o a un muestreador de aire (DUO SAS SUPER 360/SPIN AIR V2) que succionó el aire a través del mismo. En posición axial se colocó una lámpara fluorescente de luz ultravioleta A (8W o 15W) o UV-C (8W o 16W). Alrededor de la lámpara se colocaron 7 monolitos de PET impregnados de un sol-gel de TiO_2 (figura 3.18). Los monolitos se introdujeron al azar en el interior del tubo de vidrio,



de manera que el flujo del aire se rompiera al pasar de un monolito al siguiente. Para llevar a cabo estudios en paralelo se prepararon 4 reactores idénticos. Para la luz UVA la irradiancia en la pared externa del reactor a 365nm, medido con un radiómetro UV Cole Parmer VLX 3W, fue de $2.7\text{mW} \cdot \text{cm}^{-2}$. La fotoreacción se llevó a cabo a temperatura y presión ambiental.

Figura 3.18. Vista del interior del reactor tubular en el que puede observarse la lámpara en posición central y los monolitos de PET, impregnados de TiO_2 que la rodean

Las características del sistema de reacción se especifican en la siguiente tabla:

Diámetro interno del reactor	5.1 cm
Diámetro de la lámpara de UV	1.5 cm
Longitud del lecho catalítico	23.8 cm
Volumen del lecho catalítico	535.5 cm^3
Superficie catalítica	1450.4 cm^2
Longitud del monolito	5 cm
Anchura del monolito	4.5 cm
Altura del monolito	3.4 cm
Número de canales por monolito	12
Medidas del canal	$3.4 \times 0.9 \times 1.1 \text{ cm}$

Tabla 3. 5. Características del sistema de reacción fotocatalítica.

- Estudios de actividad fotocatalítica

Para los tests biológicos el reactor se acopló a uno de los dos cabezales del muestreador DUO SAS SUPER 360, actuando el otro cabezal a modo de control. En el caso del muestreador SPIN AIR, el reactor se acopló al muestreador master o esclavo, actuando el que quedaba libre como control. Los experimentos se repitieron cambiando el reactor de cabezal (derecho o izquierdo) o de muestreador (master o esclavo). En algún caso se utilizó también el impactador BioStage, con el que, debido a que consta de un solo cabezal, se tomó una muestra control y sucesivamente se le adaptó el reactor y se tomó la muestra con tratamiento. Se llevaron a cabo estudios en condiciones de flujo continuo en los que se valoró la actividad fotolítica (sin TiO_2) y fotocatalítica (con TiO_2) para desinfección de aire en condiciones reales utilizando radiación UV-A y UV-C de dos potencias diferentes.

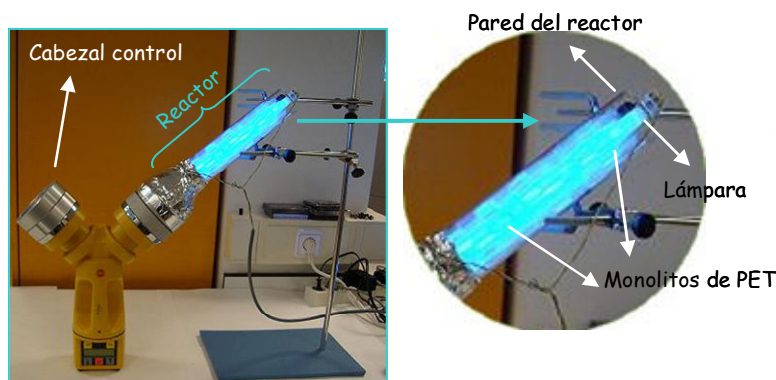


Figura 3.19. Sistema fotocatalítico utilizado en los ensayos

Se realizaron también experimentos blanco sin irradiación en los que se valoró el efecto del reactor, la lámpara apagada, los monolitos y el TiO_2 , evaluando de esa manera la adsorción de bacterias en el entramado del reactor y paredes.

Los ensayos se desarrollaron en un laboratorio de 46m^2 en el que trabajaban alrededor de 5 personas. Durante los experimentos, las ventanas y puerta permanecieron cerradas para evitar la interferencia de flujos de aire. Para evaluar el efecto del tratamiento sobre el número de UFC/m^3 de bacterias se aspiraron un total de 1800L (10min) de aire por cada cabezal del muestreador DUO SAS SUPER 360, y para hongos se muestrearon 750L (4,17min). Los volúmenes de aire se determinaron previamente en función de los valores de UFC/m^3 tomados en los días anteriores a los ensayos. Se realizaron tres repeticiones con el reactor en el cabezal derecho del muestreador y otras tres, con el mismo, en el cabezal izquierdo, actuando siempre el cabezal que quedaba libre como control. La eficiencia del reactor se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia} = \frac{\text{UFC} / \text{m}^3 \text{ control} - \text{UFC} / \text{m}^3 \text{ reactor}}{\text{UFC} / \text{m}^3 \text{ control}} \cdot 100 \quad \text{Ec. 3.6}$$

- Monolitos

Como soportes monolíticos se utilizaron estructuras en forma de panel hechas de Polietilen tereftalato (PET) con un grosor de pared de 0.15mm y una densidad de $45 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$ (WaveCore PET150-9/S, Wacotech GmbH & Co. KG) (figura 3.20). El peso medio de los monolitos sin TiO_2 fue de 3.74g. Las medidas y número de canales se indican en la tabla 3.5.

Los soportes se manejaron con guantes libres de polvo. Se cortaron con forma anular en las dimensiones requeridas para el reactor y se les hizo un anillo central para el paso de la lámpara. Antes de la impregnación, los monolitos se lavaron con agua y detergente para eliminar los restos de polvo y suciedad. Posteriormente se enjuagaron en agua destilada y se secaron en estufa a 50°C.



Figura 3.20. Monolito de PET impregnado con TiO_2 como catalizador.

- **Preparación del catalizador**



Figura 3.21. Membrana de diálisis con el sol gel en su interior

Se preparó una solución de TiO_2 mediante la técnica sol-gel, tal y como se describe en (Sánchez y col., 2006; Portela y col., 2007a; Portela y col., 2007b). Mediante éste método puede sintetizarse TiO_2 nanoestructurado de manera controlada. Como precursor se empleó isopropóxido de titanio ($\text{Ti}(\text{iOPr})_4$, Aldrich), que se añadió gota a gota a una solución de ácido nítrico (HNO_3) y agua desionizada, hasta alcanzar las proporciones de $\text{H}_2\text{O}:\text{HNO}_3:\text{Ti}(\text{iOPr})_4$ fue 900:6.5:74 (Yamazaki-Nishida y col., 1993). La solución se agitó durante 2-3 días a temperatura ambiente hasta que se obtuvo un sol estable y translúcido con un pH inferior a 1. Se produjo de esta manera la hidrólisis del precursor, catalizada por el medio ácido, y una posterior condensación (Bischoff y col., 1995).

Por lo general, una vez depositado el catalizador sobre el soporte, éste es calcinado para evaporar parte de los restos orgánicos y eliminación de los restos inorgánicos como el exceso de ácido nítrico. Sin embargo, al no soportar los monolitos de PET temperaturas superiores a 75°C, se llevó a cabo una diálisis del sol utilizando membranas de celulosa (3500 MWCO) (Anderson y col., 1993; Sánchez y col., 2006)(figura 3.21). Las membranas con el sol se introdujeron en vasos de precipitados que contenían agua destilada en continua agitación. Durante la diálisis el pH del sol fue aumentando, efectuándose varios cambios de agua, hasta conseguir un pH en los soles de 3.4, próximo al punto isoeléctrico del TiO_2 . Tanto el sol dializado como el sol sin dializar contenían partículas de TiO_2 en fase anatasa, con una pequeña contribución de brookita. Una vez dializado el tamaño del dominio cristalino fue de 3.7nm (Coronado y col., 2008; Portela, 2009).

- **Preparación de películas delgadas del catalizador**

Para conseguir la formación de películas de TiO_2 delgadas y homogéneas sobre los monolitos se empleó la técnica de "dip-coating" (Brinker y col., 1991) utilizando un dispositivo como el de la figura 3.22. El grosor de las películas se incrementó mediante un procedimiento multicapa, depositándose tres capas de catalizador. Los monolitos se introdujeron en el sol a una velocidad constante de 1.53 mm.s^{-1} , se mantuvieron sumergidos durante 5 segundos y posteriormente se retiraron a la misma velocidad. Se secaron a 50°C durante una hora entre capa y capa en estufa. Para realizar la inmersión, los monolitos se engarzaron con un hilo fino no absorbente, sujeto mediante una pinza que los mantenía

horizontales durante la inmersión. Cada monolito incorporó una cantidad media de 0.0381g del sol gel.



Los monolitos se colocaron en el espacio interanular del reactor y se irradiaron durante una noche con luz UVA para eliminar posibles efectos de inactivación inicial. Este tipo de soporte, así como su tratamiento, ha sido optimizado y caracterizado por el grupo en el que se ha desarrollado esta tesis para su empleo en otro tipo de ensayos fotocatalíticos (Sánchez y col., 2006; Portela y col., 2007b; Coronado y col., 2008).

Figura 3.22. Dispositivo empleado para la impregnación del monolito

- **Lámparas utilizadas en los ensayos**

Con objeto de garantizar la reproducibilidad de los ensayos, las lámparas se encendieron durante 30 minutos antes del comienzo de los experimentos para estabilizar su irradiancia. A continuación se muestran los modelos de lámparas empleados en función de su potencia y la longitud de onda de máxima emisión:

	8W	15W	16W	36W
UV-A(λ_{max} :360nm)	TL 8W/05 Actinic	CLEO compact FAM (Philips)		
UVC (λ_{max} :258nm)	TUV FAM (Philips)		TUV FAM (Philips)	SterilAir UVC 2030-2K

Tabla 3. 6. Lámparas utilizadas en los ensayos con reactor tubular.

- **Estudios de envejecimiento**

Uno de los reactores fotocatalíticos tubulares de vidrio borosilicato, se mantuvo funcionando durante dos años en posición vertical, conectado en uno de sus extremos a una bomba de pistón con un caudal de 2L/min (Tetratec, Tetra GmbH). La lámpara de UV-A 8W 05 Actinic se cambió en dos ocasiones durante el tiempo que duró el experimento. Durante ese tiempo de realizaron medidas de eficiencia en desinfección fotocatalítica de la manera descrita anteriormente utilizando el muestreador DUO SAS SUPER 360.

- **Análisis SEM-EDX (microscopía electrónica de barrido acoplado a un detector de fluorescencia de rayos x)**

Los fotocatalizadores utilizados en los ensayos de desinfección por fotocatálisis se analizaron con un microscopio electrónico de barrido Philips XL30 JSM-5600LV (con un voltaje de aceleración de 20KV y una distancia de trabajo de 20mm) acoplado a un analizador EDAX INCA-sight (Oxford instruments).

Las muestras se pretrataron de la siguiente manera: primero se fijaron con glutaraldehído (2.5%) durante 2 horas y después se lavaron dos veces con una solución de cacodilato sódico (0.2M, pH=7.1), 30 minutos. A continuación, las muestras se deshidrataron en soluciones de etanol al 20, 40 y 80%, durante 20 minutos. El etanol se

cambió por CO_2 líquido en un secador de punto crítico BAL-TEC CPD030 durante 10 minutos y se calentó durante 20 minutos para alcanzar el punto crítico de CO_2 (80 bar y 40°C). Las muestras se montaron sobre portas de grafito y se cubrieron con oro en un SC7620 Polaron sputter coater (Thermo VG Scientific).

3.6.2. Reactor a escala demostración

- **Configuración del reactor**

Gracias a la colaboración del CIEMAT y la empresa Aire Limpio, se diseñó, construyó e instaló un prototipo de reactor fotocatalítico-fotolítico para ser ensayado en aire interior real, en condiciones reales de trabajo (figura 3.23). El equipo se situó en un despacho de $41,6\text{m}^3$ en el que trabaja habitualmente una persona. El reactor se fabricó en aluminio y se conectó a la salida de aire de un equipo de aire acondicionado Mitsubishi (Air Conditioner model SEZ-KD25VA). Sus dimensiones de $60 \times 30\text{cm}$ pudieron albergar de 3 a 9 lámparas que se introdujeron en la caja rectora en tres bancos de tres lámparas cada uno. Entre las lámparas, una serie de raíles permitieron fijar hasta 4 filas de catalizadores. En el exterior, mediante una caja de interruptores se seleccionaron las lámparas que iban a encenderse, existiendo la posibilidad de accionarlas desde el exterior del despacho (figura 3.24). El aire interior de la habitación circuló por el interior del reactor a una velocidad de $220\text{m}^3/\text{h}$. En el anexo I se muestran los planos del equipo.



Figura 3.23. Vista del reactor a escala demostración en la oficina en la que se realizaron los ensayos. Los muestreadores DUO SAS SUPER 360 se situaron sobre la mesa del despacho para la toma de muestras.

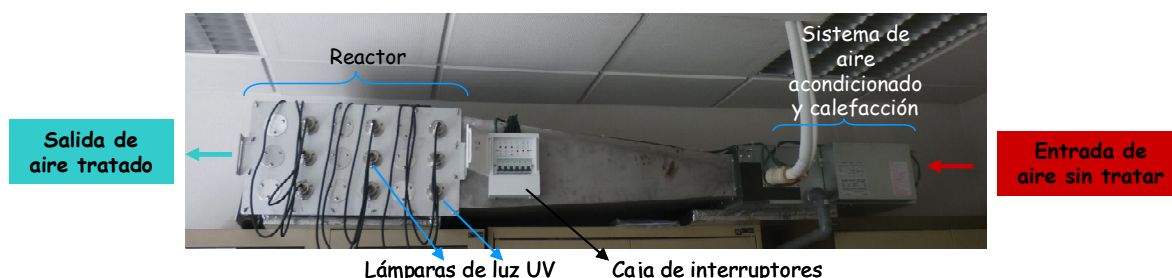


Figura 3.24. Fotografía del reactor a escala demostración en la que se señalan las diferentes partes que lo componen

- **Estudios de actividad fotolítica y fotocatalítica**

La toma de muestra se llevó a cabo mediante dos impactadores DUO SAS SUPER 360 enfrentados, a una distancia de un metro aproximadamente uno del otro, colocados sobre la mesa del despacho a 1.50 metros del suelo. En algunos ensayos comparativos, se utilizaron dos impactadores SPIN AIR V2 con su esclavo. Las lámparas y los catalizadores empleados se introdujeron en el reactor el día previo al ensayo y se sellaron las ventanas del despacho para evitar la entrada de aire exterior. El equipo de aire acondicionado y calefacción permaneció siempre encendido.

Las muestras se recogieron de la siguiente manera: se tomaron 5 muestras consecutivas de 200L con medio AEM, para la recogida de hongos, y medio AN, para la

recogida de bacterias, por duplicado, lográndose de esta manera el análisis de un volumen total de aire de 1000L. Al comienzo de cada ensayo, se abrieron las puertas del despacho durante 2 horas y posteriormente se tomaron 5 muestras controles manteniendo la puerta del despacho abierta. Durante los tratamientos, el despacho permaneció vacío y su puerta se mantuvo cerrada. Una vez apagadas las lámparas, se entró a la oficina exclusivamente para la toma de cada muestra post-tratamiento.

La evaluación de la eficiencia de los tratamientos fotolíticos o fotocatalíticos se llevó a cabo mediante dos tipos de estudios:

- Variando la duración de los tratamientos mediante el encendido de las lámparas durante 1,2 o 4 horas.
- Variando la intensidad de la luz mediante el encendido de 3 o 9 lámparas.

Los ensayos se realizaron con y sin catalizadores, con lámparas de UV-A o de UV-C. En los tratamientos fotocatalíticos, con el aumento de número de lámparas activas, se incrementó también el número de monolitos que se introducían en el reactor. En ensayos con tres lámparas se introdujeron en el reactor dos filas de catalizadores, mientras que en ensayos con 9 lámparas, se introdujeron tres filas de catalizadores. Una vez finalizados los tratamientos se tomaron muestras de hongos y bacterias por duplicado mediante dos muestreadores DUO SAS SUPER 360. Las muestras se tomaron cada 10, 20, 25, 30 o 90 minutos durante tiempos de entre 1 y 4 horas. Adicionalmente, se tomaron muestras de hongos y bacterias en el pasillo colindante al despacho, emplazando los muestreadores a la misma altura con respecto al suelo (1.50m) y en el exterior, depositando los muestreadores en la cornisa de una ventana contigua al despacho. Cada ensayo se realizó por triplicado para corroborar la reproducibilidad de los resultados. Mediante las viabilidades de los microorganismos estudiados, antes y después de los tratamientos, se calculó la eficiencia del tratamiento o porcentaje de destrucción en tanto por ciento (ver apartado 3.6.1.) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$Eficiencia = \frac{UFC / m^3 \text{ pretratamiento} - UFC / m^3 \text{ postratamiento}}{UFC / m^3 \text{ pretratamiento}} \cdot 100 \quad \text{Ec. 3.7}$$

• Monolitos

Para los ensayos realizados se han utilizado monolitos de aluminio con estructura en panel de abeja de 60x30cm (DURA-CORE II 5052, Alcore)(figura 3.25). Para facilitar el pretratamiento y la deposición del catalizador, los monolitos se cortaron por la mitad (30x30). Se lavaron con agua destilada y jabón durante 5 minutos y posteriormente, se aclararon con agua destilada y se introdujeron en un baño de acetona durante 5 minutos. Se volvieron a aclarar con agua destilada durante 5 minutos y se dejaron secar antes de su pretratamiento con NaOH. El pretratamiento provocó un aumento de la rugosidad de la superficie de aluminio lo que facilitó el pegado del sol de TiO_2 evitándose de esta manera, su desprendimiento posterior. Se sumergieron las planchas, completamente, en un baño de NaOH al 5% con una temperatura de 55°C, durante 2min. y 30seg. Posteriormente, se aclararon con agua destilada, se dejaron secar a temperatura ambiente y finalmente se introdujeron en una estufa a 100°C durante 1 hora.

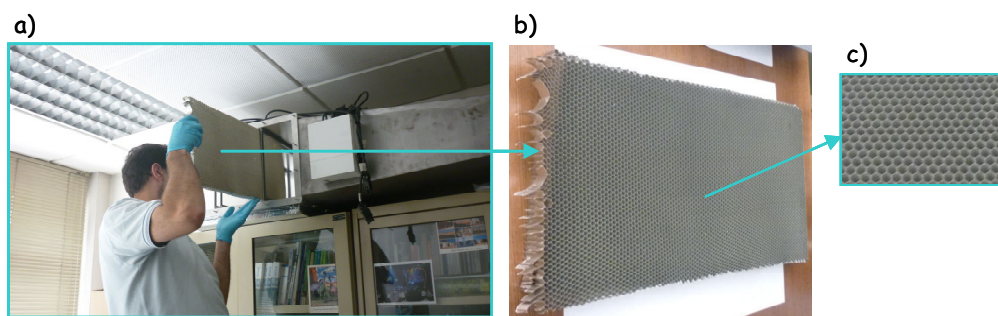


Figura 3.25. a) Inserción del monolito metálico, con TiO_2 depositado, en el reactor, b) vista de la plancha de monolito con estructura en panel de abeja (c)

- **Preparación del sol gel de TiO_2**

Como ocurrió con los monolitos de PET, los monolitos de aluminio tampoco podían someterse a altas temperaturas, por consiguiente, el sol gel se preparó tal y como se describe en el apartado 3.6.1.

- **Formación de películas finas de catalizador**

Los monolitos se impregnaron con el catalizador mediante la técnica "dip-coating" utilizando el dispositivo empleado para el recubrimiento de los monolitos de PET con algunas modificaciones, manteniendo la velocidad de inmersión a 1.53 mm.s^{-1} (figura 3.26). Mediante un cable de aluminio se engarzó el monolito a una plancha del mismo material que permitió que éste se sumergiera en el sol-gel en posición horizontal. Cada monolito permaneció sumergido durante 30 segundos.

Se depositaron 5 capas de TiO_2 , secando los monolitos primero a temperatura ambiente y después a 100°C en estufa durante 1 hora, entre capa y capa (Muñoz-Vicente y col., 2012). La cantidad óptima de catalizador (5 capas) depositado sobre el sustrato (monolitos de aluminio), se determinó en ensayos a pequeña escala con fragmentos de monolitos, consiguiéndose recubrimientos lo bastante finos y transparentes como para que las partículas de TiO_2 más profundas de la capa pudieran absorber radiación.

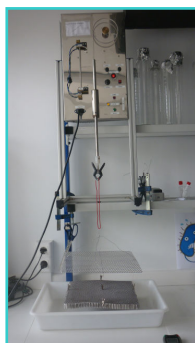


Figura 3.26. Dispositivo utilizado para la impregnación del monolito de aluminio

La fotoactividad del catalizador soportado sobre el monolito de aluminio se verificó mediante ensayos de degradación de tricloroetileno en un reactor plano. La capacidad bactericida se evaluó mediante ensayos de supervivencia de la bacteria *E. coli* en fragmentos procedentes de los catalizadores, iluminados con lámparas de luz UV-A o UV-C (Muñoz-Vicente y col., 2012).

- **Lámparas utilizadas en los ensayos**

Se emplearon dos tipos de lámparas de 36W de 56cm de longitud y 2cm de diámetro. En la tabla 3.7 se muestran los modelos de lámparas y la longitud de onda de máxima emisión:



UV-A 36W (λ_{max} : 360nm)	LightTech 6CL587T5
UV-C 36W (λ_{max} : 258nm)	Steril Air 2030-2k

Tabla 3. 7. Lámparas utilizadas en los ensayos con los reactores de Aire Limpio

Figura 3.27. Introducción de las lámparas de luz UV en el reactor.

- **Caracterización del catalizador y los monolitos**

Los monolitos de aluminio con y sin catalizador fueron caracterizados mediante adsorción/desorción de N_2 , SEM-EDX y difracción de rayos X (XRD) (Muñoz-Vicente y col., 2012).

- **Temperatura y humedad relativa**

El equipo de aire acondicionado y calefacción (Mitsubishi) permaneció en funcionamiento durante todo el tiempo en el que transcurrieron los ensayos. La temperatura se mantuvo a 21°C y se trabajó siempre a una humedad relativa ambiental de entre el 30 y 40%.

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente utilizando SPSS para Windows (version 14.0).

Se llevó a cabo la prueba de Shapiro-Wilk, para tamaños muestrales iguales o menores de 50 para contrastar la hipótesis de que las muestras obtenidas procedían de poblaciones normales (Shapiro y col., 1965). Cuando el nivel de significación > 0.05 podemos asumir que los datos siguen una distribución normal. Se utilizó la prueba de Levene, cuando se quiso contrastar el supuesto de homogeneidad de varianzas. Cuando el nivel de significación de la prueba fue < 0.05 se rechazó la hipótesis de igualdad de varianzas (Levene, 1960).

Los datos que siguieron una distribución normal y cumplieron el supuesto de homocedasticidad (igualdad de varianzas) se sometieron a la prueba de análisis de varianza, ANOVA, de un factor (Brown y col., 1974). Mediante esta prueba puede contrastarse la hipótesis de igualdad de medias en las poblaciones analizadas. Para un nivel de significación > 0.05 , se puede asumir que las medias de nuestros datos son iguales. En el caso de muestras con varianzas diferentes, se utilizaron las pruebas de Welch y Brown-Forsythe, que son pruebas robustas de igualdad de medias alternativas al ANOVA en estos casos (Welch, 1951; Brown y col., 1974). Mediante el análisis post-hoc o a posteriori de Games-

Howell se precisó en que muestras se encontraban las medias que diferían (Games y col., 1976). En el caso de muestras con tamaño menor de 30, varianzas no homogéneas o distribución no normal, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis, alternativa al ANOVA en estos casos (Kruskal y col., 1952). Este tipo de prueba se utiliza cuando resulta demasiado arriesgado asumir normalidad y homocedasticidad, especialmente cuando las muestras son pequeñas y/o los tamaños muestrales desiguales. Para saber que medias diferían concretamente, tras realizar la prueba de Kruskal-Wallis, $p < 0.05$, se llevaron a cabo comparaciones por pares utilizando la prueba de Mann-Whitney, aplicable para muestras sin distribución normal y tamaño muestral pequeño ($N < 30$) fijando el nivel de significación en 0.01 en este caso (Mann y col., 1947) o la prueba T de Student, cuando las distribuciones fueron normales y las varianzas iguales (Student, 1908).

Para la comparación de las medias de UFC/m³ en experimentos con tratamiento o sin tratamiento fotolítico o fotocatalítico, se empleó la prueba T de Student. Previamente se comprobó que la distribución de los datos de UFC/m³ de dichas muestras seguía una distribución normal mediante el test de Shapiro-Wilks o que las varianzas eran iguales mediante el test de Levene.

Para estudiar el grado de relación entre dos variables, se realizaron correlaciones bivariadas. Una relación lineal positiva entre dos variables indica que los valores de las dos variables varían de forma parecida (ejemplo: cuando el valor de una aumenta, el valor de la otra también lo hace). Una relación lineal negativa indica que estas variables, se comportan de manera opuesta (ejemplo: Cuando una aumenta, la otra disminuye). Se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson (estudia el grado de relación lineal existente entre dos variables cuantitativas) que toma valores entre -1 y 1, indicando un valor de 1, una relación lineal perfecta positiva y un valor de -1 una relación lineal perfecta negativa (Pearson, 1896). Un valor de 0, indica relación lineal nula. Se realizó una prueba de significación en el que la hipótesis nula fue que el valor del coeficiente era cero. Cuando se incumplía el supuesto de normalidad, se calculó el coeficiente de correlación *rho* de Spearman (Spearman, 1904), el cual se interpretó de la misma manera que el coeficiente de correlación de Pearson.

4. RESULTADOS

4.1. PUESTA A PUNTO DE UNA METODOLOGÍA DE TOMA DE MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS DE AIRE.

Con el fin de optimizar una metodología de toma de muestra de hongos y bacterias en aire, se muestreó en una biblioteca de la facultad de Psicología de la Universidad Autónoma de Madrid utilizando medios de cultivo (AN y LB, en el caso de bacterias y AEM y AS, en el caso de hongos; ver apartado 3.5.1) o el tampón PBS. Se seleccionaron dos medios de cultivo comunes para el cultivo, tanto de hongos como de bacterias, con el objetivo de escoger uno de ellos para los ensayos posteriores (estos medios fueron elegidos previamente por permitir el crecimiento de una mayor diversidad microbiana durante varios muestreos en la misma biblioteca, en los que se emplearon diversos medios específicos y generales para el cultivo de hongos y bacterias; datos no mostrados). La recolección se llevó a cabo de forma pasiva, tal como se ha descrito en el apartado 3.3.1 de la metodología. Durante los muestreos en la biblioteca la temperatura media fue de 20.5°C y la humedad relativa del 46.7%.

Posteriormente se caracterizaron hongos y bacterias, como parte de un estudio sobre calidad de aire, durante la puesta en marcha de varios edificios bioclimáticos de la Península Ibérica. Dichos edificios estaban localizados en zonas de climatología muy distinta, como son Almería, donde además se muestreó dos veces en la costa y dos veces en el desierto de Tabernas, Soria y Madrid. Las muestras se tomaron de forma pasiva con los medios AEM y AN y de forma activa, por aspiración de aire sobre filtros (ver apartado 3.5. 2 de la metodología).

La caracterización de hongos y bacterias se realizó de acuerdo a los métodos experimentales descritos en el apartado 3.4.

4.1.1. Caracterización de bioaerosoles mediante métodos de muestreo pasivos de una biblioteca universitaria.

Las placas con las que se llevó a cabo el muestreo en la biblioteca presentaron un promedio de 60-110 UFC/placa.

En el caso de bacterias, se amplificó el gen 16S ARNr de cada colonia con morfología diferente aislada en las placas, con los cebadores universales para el Dominio Bacteria (27F-1492R) para su posterior secuenciación e identificación (ver apartado 3.4.8 de la metodología). Los resultados se muestran en la tabla 4.1.a. Del medio AN se aislaron un mayor número de colonias y se obtuvo mayor diversidad microbiana, por lo que se continuó con el mismo en los muestreos sucesivos)

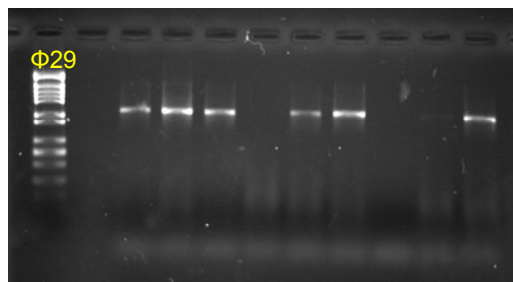


Figura 4. 1. Ejemplo del un gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio. Se muestra la amplificación del gen 16S ARNr completo de las colonias aisladas en la biblioteca en medio Agar Nutritivo. Se utilizó como marcador de peso molecular Φ29-HindIII.

El tampón PBS, contenido en placas que se dejaron abiertas en la biblioteca, se recogió en tubos Eppendorf, que se centrifugaron para concentrar las bacterias presentes en la solución.

A continuación, se realizó una extracción de ADN y una amplificación génica (kit Genomiphi) tal y como se especifica en el apartado 3.4.6. de la metodología. Posteriormente, se llevó a cabo la amplificación de un fragmento del gen 16S ARNr (cebadores 341GC-907R) y su separación mediante la técnica de electroforesis en gradiente desnaturalizante (DGGE) (apartado 3.4.13). Mediante el protocolo seguido, se consiguieron diferenciar únicamente 5 bandas, que se recortaron, se eluyeron en agua destilada y se reamplificó el fragmento del gen 16S ARNr (cebadores 341-907R) de los microorganismos presentes, se purificó y se secuenció, obteniéndose solamente dos secuencias que se identificaron mediante comparación con las bases de datos del NCBI (figura 4.2) (tabla 4.1b).

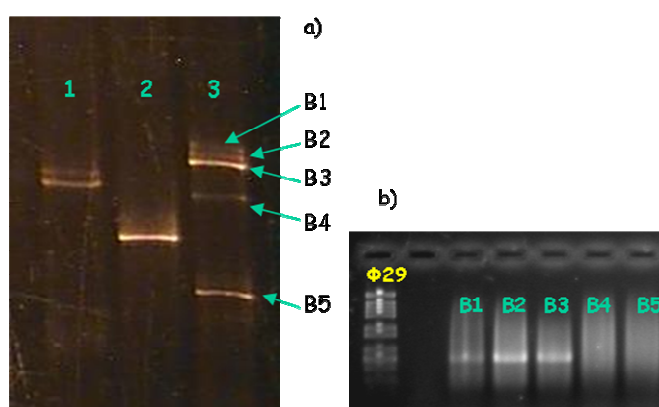


Figura 4. 2. a) Patrones de bandas de los fragmentos de 16S ARNr en gel de gradiente desnaturalizante de las muestras procedentes de la biblioteca. Se señalan las bandas que fueron recortadas. b) Gel de agarosa en el que se muestra la reamplificación del fragmento del gen de las bandas recortadas.

En las placas de AEM empleadas para el muestreo de hongos en la biblioteca, se aislaron un total de 13 colonias fúngicas y posteriormente se identificaron mediante atlas y claves taxonómicas de acuerdo a la morfología de sus colonias y sus características microscópicas.

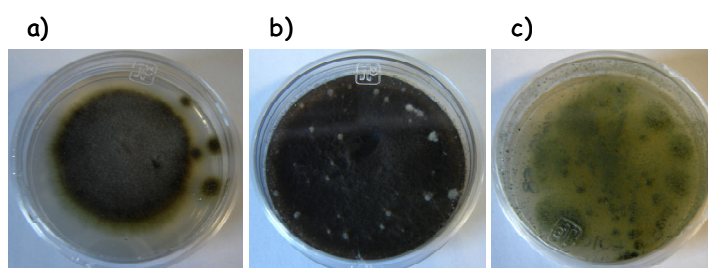


Figura 4. 3. Colonias de a) *Cladosporium*, b) *Alternaria* y c) *Penicillium* aisladas en la biblioteca en Agar Extracto de Malta.

El 70% de los hongos aislados procedentes de la biblioteca pertenecieron al grupo dematiáceos, de los que se identificaron los géneros *Cladosporium* y *Alternaria* como predominantes (Ellis, 1971; Ellis, 1976). El 30% restante correspondieron al género *Penicillium* (Ramírez, 1982). En los muestreos posteriores se empleó únicamente el medio AEM, debido a que del mismo se aisló una mayor diversidad de géneros fúngicos en la biblioteca muestreada.

RESULTADOS

Filo (Phylum)	Clase/orden	Género	Especie	Número de acceso	% similitud	Gram
Proteobacteria	α-proteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	<i>S. aerolata</i>	AJ429240	100%	negativa
			<i>A. lwoffii</i>	EF204283	100%	negativa
			<i>A. lwoffii</i>	DQ341260	98%	negativa
	γ-proteobacteria	<i>Acinetobacter</i>	<i>A. calcoaceticus</i>	X81668	99%	negativa
			<i>A. johnsonii</i>	EF114343	99%	negativa
Bacteroidetes	Sphingobacteria	<i>Pantoea</i>	<i>P. ananatis</i>	DQ133546	99%	negativa
		<i>Pedobacter</i>	<i>P. cryoconitis</i>	AM237384	100%	negativa
		<i>Curtobacterium</i>	<i>C. flaccumfaciens</i>	AM410689	100%	positiva
		<i>Rhodococcus</i>	<i>R. corynebacterioides</i>	EF204434	100%	positiva
		<i>Arthrobacter</i>	<i>A. nicotianae</i>	EF030728	99%	positiva
Actinobacteria	Actinobacteria	<i>Dermaococcus</i>	<i>A. agilis</i>	AJ577725	99%	positiva
				DQ457589	100%	positiva
		<i>Kocuria</i>	<i>K. rhizophila</i>	AY030315	98%	positiva
			<i>K. carniphila</i>	AM237391	100%	positiva
		<i>Clavibacter</i>	<i>C. michiganensis</i>	AM410696	100%	positiva
		<i>Brevibacterium</i>	<i>B. sanguinis</i>	AB288106	99%	positiva
		<i>Rothia</i>	<i>R. amarae</i>	AY043359	99%	positiva
		<i>Micrococcus</i>	<i>M. luteus</i>	EF187229	100%	positiva
		<i>Staphylococcus</i>	<i>S. croceolyticus</i>	AY953148	100%	positiva
		<i>Bacillus</i>	<i>B. megaterium</i>	EF114346	99%	positiva

a)

Banda	Filo	Clase/orden	Género	Especie	Número de acceso	%similitud	Gram
2	Proteobacteria	α-proteobacteria	<i>Phyllobacterium</i>	<i>P. myrsinacearum</i>	AY785332	100%	negativa
3			<i>Paracoccus</i>	<i>P. denitrificans</i>	AB680283	98%	negativa

b)

Tabla 4. . Resultados del análisis de las secuencias obtenidas en las muestras bacterianas procedentes de la biblioteca, utilizando el programa BLAST: a) muestras aisladas en los medios de cultivo AN y LB ; b) muestras aisladas en tampón PBS.

4.1.2. Caracterización de bioaerosoles por métodos pasivos y activos en tres ambientes diferenciados: Madrid-Soria-Almería.

En las muestras bacterianas aisladas en medio de cultivo, se amplificó el gen 16S ARNr de cada colonia con morfología diferente aislada en las placas, con los cebadores universales para el Dominio Bacteria (27F-1492R) para su posterior secuenciación e identificación (ver apartado 3.4.8 de la metodología).

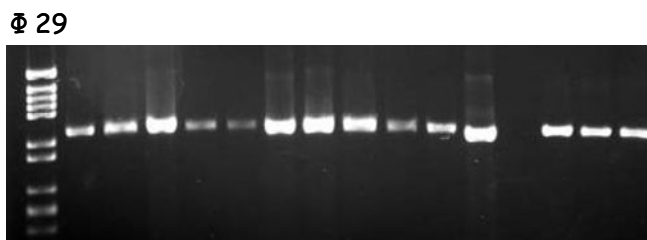


Figura 4. 4. Ejemplo del un gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio. Se muestra la amplificación del gen 16S ARNr completo de las colonias aisladas en el edificio de Almería costa, en medio Agar Nutritivo. Se utilizó como marcador de peso molecular Φ 29-HindIII.

Con el objetivo de reducir el número de secuenciaciones, se llevó a cabo el corte con enzimas de restricción del gen 16S ARNr, procedente de cada colonia y amplificado mediante PCR y se secuenciaron únicamente las muestras con patrones de restricción diferentes (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLPs) (figura 4.5) (apartado 3.4.10.).

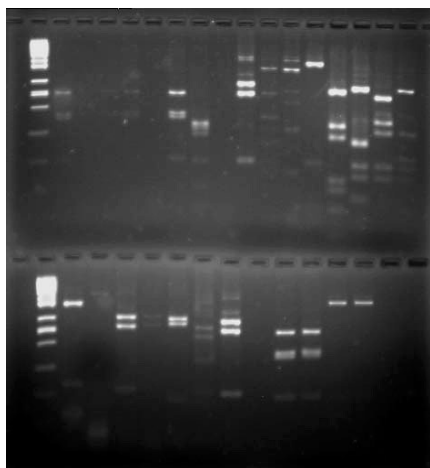


Figura 4. 5. Gel de agarosa al 1% en el que se muestra, a modo de ejemplo, algunos de los patrones de restricción obtenidos a partir de la digestión con la enzima Sau 3AI del gen 16S ARNr. Las muestras pertenecían al edificio de Almería costa.

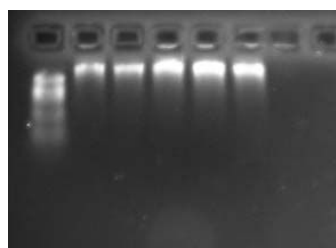


Figura 4. 6. Resultado de la extracción de ADN de 5 filtros procedentes de un muestreo en el edificio de Almería costa.

Los filtros se analizaron de la manera descrita en el apartado 3.4.5. de la metodología, dividiéndose éstos en dos mitades. En una de ellas, se extrajo el ADN bacteriano (figura 4.6) y posteriormente se amplificó y se clonó en células competentes (células capaces de sufrir una transformación, es decir, de incorporar material genético del ambiente) el gen 16S ARNr (apartado 3.4.14). En la otra mitad, se extrajo de igual manera el ADN de las células y se amplificó un fragmento del mismo gen mediante los cebadores universales para el dominio Bacteria, 341F-GC y 907R, separándose los fragmentos amplificados mediante

DGGE (apartado 3.4.13.). Adicionalmente, algunos fragmentos de los filtros se tiñeron con el colorante fluorescente DAPI y se visualizaron al microscopio de fluorescencia para comprobar la existencia de bacterias adheridas a los filtros. Se observaron cúmulos de aspecto fibroso a los que quedaban adheridas las bacterias (figura 4.7.a). Con algunos fragmentos de los filtros también se realizó una tinción que permitía diferenciar las bacterias viables de las no viables al microscopio de fluorescencia (figura 4.7.b) (apartado 3.4.5).

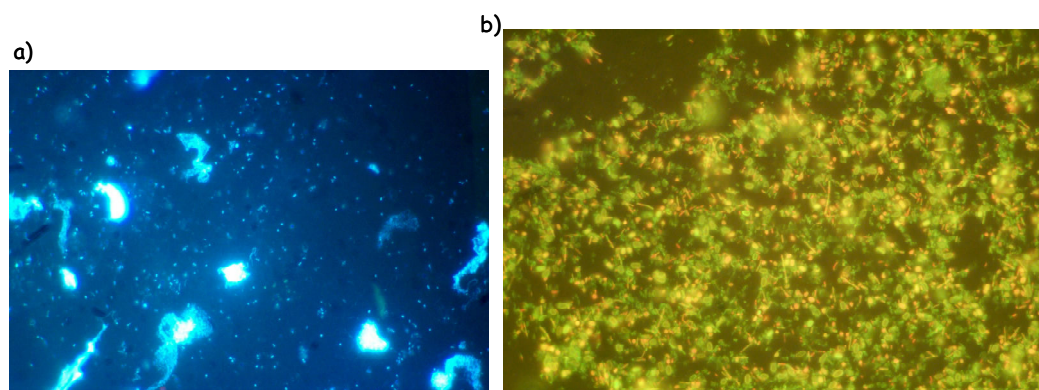


Figura 4. 7. Imagen de un fragmento de uno de los filtros utilizados en los muestreos teñidos con a) DAPI y b) Prueba de viabilidad (las células vivas se observan de color verde (colorante SYTO9), mientras que las muertas se ven en rojo (colorante Propidium Iodide).

Los geles de DGGE mostraron que la mayoría de las bandas que aparecían en los mismos, se repetían en los diferentes muestreos realizados, con mayor o menor intensidad, independientemente del edificio y su localización. Esas bandas también eran consistentes a lo largo del tiempo y volvían a aparecer en muestreos continuados, como puede observarse en la figura 4.8.

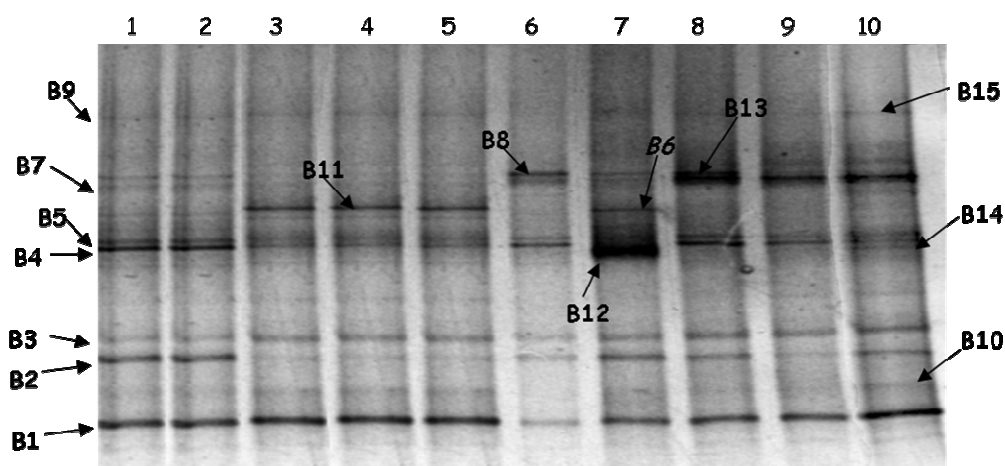


Figura 4.8. Gel de acrilamida/bisacrilamida con gradiente desnaturizante 20-55% de urea/formamida donde se señalan las bandas que fueron reamplificadas y secuenciadas de muestras procedentes de filtros de los muestreos de Almería (Almería desierto: carriles 1-4; Almería costa: carril 5), Soria (carril 6) y un segundo muestreo en la Almería desierto (carriles 7-10).

En la siguiente tabla se muestran los resultados de las especies y géneros de bacterias identificadas en los muestreos de Almería, Madrid y Soría:

Filo (Clase)	Frec. interior (%)	Frec. exterior (%)	Resultados BLAST	Edificios Bioclimáticos				Medio de cultivo	Filtros	
				Almería Costa	Desierto	Madrid	Soria		DGGE	Clonación
Firmicutes (Bacilli)	67	29	<i>Bacillus subtilis</i>	x	x	x	x	x	x	x
	10	71	<i>B. licheniformis</i>	x		x		x		x
	5	29	<i>B. simplex</i>	x		x		x		
	14	29	<i>B. cereus</i>	x				x		
	29	0	<i>B. pumilus</i>	x	x		x	x	x	
	19	0	<i>B. firmus</i>	x	x			x		
	10	29	<i>B. megaterium</i>	x	x	x		x		x
	19	14	<i>B. mojavensis</i>	x		x		x		x
	38	71	<i>B. thuringiensis</i>	x		x		x		x
	0	14	<i>B. alcalophilus</i>	x				x		
	5	29	<i>Staphylococcus equorum</i>	x				x		
		14	<i>S. aureus</i>	x						x
	24	0	<i>S. saprophyticus</i>		x	x		x		x
	14	0	<i>S. xylosus</i>		x	x		x		x
	5	0	<i>S. lentus</i>		x					x
	5	0	<i>S. epidermidis</i>		x					x
	5	0	<i>Staphylococcus sp.</i>		x					x
	33	29	<i>Planococcus mcmeekinii</i>	x	x			x		x
	43	71	<i>P. rifietoensis</i>	x	x	x	x	x	x	x
	33	0	<i>P. psychrophilus</i>	x	x	x		x	x	x
	14	0	<i>Aerococcus urinae</i>			x		x		x
	5	0	<i>A. viridans</i>			x				x
	5	0	<i>Streptococcus pyogenes</i>			x				x
	5	0	<i>S. pneumoniae</i>			x				x
	0	14	<i>Sporosarcina aquimarina</i>	x				x		
	10	0	<i>Lactobacillus plantarum</i>			x		x		x
	5	71	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	x		x		x		
Actinobacteria (Actinobacteria)	48	0	<i>Arthrobacter crystallites</i>	x	x		x	x	x	x
	14	71	<i>A. crystallopoietes</i>	x		x		x		x
	14	71	<i>A. polychromogenes</i>	x		x		x		x
	62	14	<i>A. aurescens</i>	x	x		x	x	x	x
	5	0	<i>A. oxydans</i>	x				x		
	24	0	<i>A. arilaitensis</i>	x	x			x	x	x
	5	14	<i>A. keisery</i>	x				x		x
	5	0	<i>A. citreus</i>			x				x
	10	0	<i>Streptomyces galilaeus</i>	x		x		x		x
	24	0	<i>Streptomyces sp.</i>	x	x		x	x	x	
	19	0	<i>Micrococcus luteus</i>		x	x		x		
	5	0	<i>M. albus</i>			x				x
	38	86	<i>Kocuria rosea</i>	x		x		x		x
	14	0	<i>Agrococcus jenensis</i>	x		x		x		x
	19	14	<i>Brachybacterium zhongshanense</i>	x		x		x		
	5	0	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>			x				x
	5	0	<i>Nocardia aesteroides</i>			x				x
Proteobacteria (β-Proteobacteria)	14	0	<i>Alcaligenes faecalis</i>	x	x	x		x		x
	5	0	<i>Eikenella corrodoens</i>			x				x
Proteobacteria (γ-Proteobacteria)	67	86	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	x	x	x	x	x	x	x
	52	71	<i>P. syringae</i>	x	x	x		x	x	x
	57	86	<i>P. fluorescens</i>	x	x	x		x	x	x
	10	0	<i>P. fragi</i>		x		x	x		x
	5	0	<i>P. oryzihabitans</i>		x					x
	5	0	<i>P. synxantha</i>		x					x
	38	0	<i>Xanthomonas campestris</i>	x	x			x	x	x
	19	0	<i>X. maltophilia</i>	x	x		x	x		x
	67	0	<i>Escherichia coli</i>	x	x	x	x	x	x	x
	24	0	<i>Serratia marcescens</i>	x	x	x		x		x
	24	0	<i>Francisella tularensis</i>	x	x	x	x	x	x	x
	5	14	<i>Psychrobacter alimentarius</i>	x		x				x
	10	0	<i>Pantoea ananatis</i>	x	x			x		x
	10	0	<i>Oceanimona baumannii</i>	x	x			x		x
	14	0	<i>Shigella dysenteriae</i>	x	x	x		x		x
	5	0	<i>Pasteurella multocida</i>			x				x
Bacteroidetes	5	0	<i>Flavobacterium indologenes</i>	x		x		x		x
	5	0	<i>Bacteroides vulgatus</i>	x				x		

Tabla 4. 2. Especies y géneros de bacterias que presentaron homología en las bases de datos del NCBI con las muestras aisladas en los edificios bioclimáticos. El porcentaje de homología con las secuencias coincidentes fue del 98-100%.

En el estudio realizado en los edificios de Almería costa, Almería-desierto, Madrid y Soria, se identificaron un total de 31 géneros bacterianos. Los géneros que presentaron mayor número de especies y su frecuencia de aislamiento fueron: *Bacillus* (10 spp., 32%), *Arthrobacter* (8 spp., 26%), *Pseudomonas* (6 spp., 19%) y *Staphylococcus* (6 spp., 19%) (tabla 4.2). Los resultados de identificación, tanto de bacterias como de hongos, engloban la totalidad de las muestras tomadas en cada edificio.

Con respecto a la caracterización de hongos, los resultados de identificación por métodos no moleculares mostraron un gran número de hongos dematiáceos en Almería, Madrid y Soria. *Cladosporium*, *Penicillium* y *Aspergillus* se identificaron junto con levaduras en ambos edificios de Almería y Madrid, mientras que *Alternaria* y *Trichoderma* únicamente se detectaron en los muestreos de Madrid. Se detectaron mucorales en las tres comunidades, aunque en Almería, solo se identificaron en el edificio de Almería desierto (figura 4.9). Las muestras de aire exterior no presentaron diferencias destacables con respecto a las interiores (datos no mostrados). Las pruebas bioquímicas a las que se sometieron las levaduras aisladas en este trabajo, no proporcionaron ningún resultado positivo por lo que no pudieron identificarse (apartado 3.4.2).

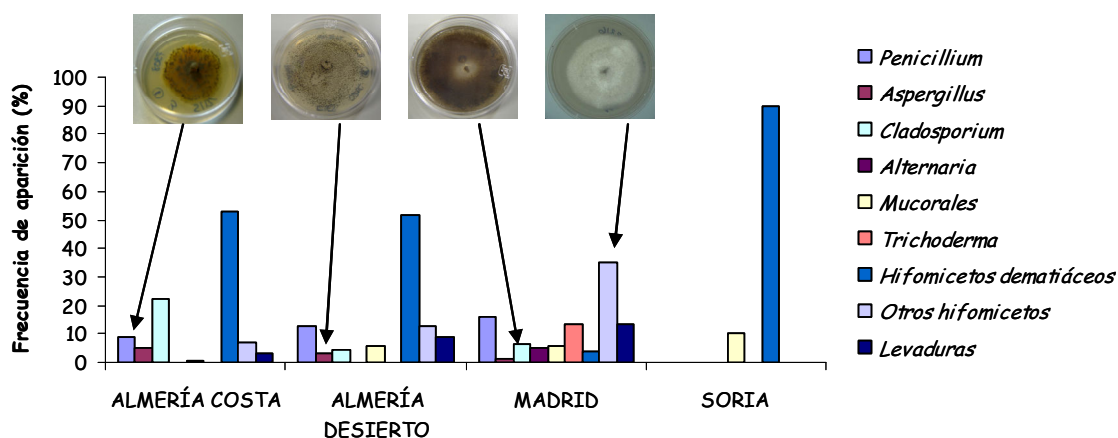


Figura 4.9. Frecuencia de aparición (%) de los géneros u órdenes de hongos identificados en aire interior de los edificios bioclimáticos de Almería costa, Almería desierto, Madrid y Soria. En las fotografías de muestra algunas de las cepas aisladas en placas de AEM de 6cm.

Mediante microscopía óptica se identificaron géneros de hongos pertenecientes a los grupos Zygomycota y Deuteromycota. Una relación de las fotografías seleccionadas de los géneros que se identificaron con mayor frecuencia se muestra en el anexo I. Con el objetivo de realizar una identificación hasta el nivel de especie, se escogió uno de los edificios, el de Madrid, con mayor variedad de géneros identificados. De entre todo el tamaño muestral de dicho edificio, se seleccionaron 40 cepas de hongos filamentosos y 7 levaduras, representativos de los grupos identificados por microscopía. Con dichas muestras se llevó a cabo una extracción de ADN para la posterior amplificación y secuenciación de la región ITS. Se compararon las secuencias obtenidas con las bases de datos del Genbank, obteniéndose especies de los filos Ascomycota, Deuteromycota y Basidiomycota. La relación entre las cepas identificadas se representó gráficamente mediante un cladograma obtenido mediante el método de Neighbor-joining (figura 4.10) (ver apartados 3.4.7, 3.4.8 y 3.4.15 de la metodología). Mediante el método de máxima parsimonia se obtuvieron resultados similares (datos no mostrados) (Swofford, D. L. 2002. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Las cepas se

volvieron a sembrar AEM para la confirmación de los resultados de identificación, fotografiándose las estructuras microscópicas de interés, así como las colonias, mostrándose una selección de las mismas en el anexo I junto con una breve descripción de los géneros.

En la figura 4.10 se muestra el cladograma obtenido con las secuencias de las regiones ITS de las cepas de hongos filamentosos. Los datos obtenidos mediante el análisis molecular concordaron con los obtenidos por observaciones al microscopio óptico. Además, aportaron una valiosa información sobre aquellas cepas que no llegaron a esporular y no pudieron identificarse en las condiciones de incubación utilizadas, clasificadas inicialmente como un gran grupo general denominado hifomicetos. Las características microscópicas y morfológicas de las cepas identificadas coincidían con las consultadas en la bibliografía para cada especie (Samson y col., 2004b).

En la base del árbol, se localizó *Strobilurus esculentus* y la cepa **H03-13** con un índice de bootstrap (bs.) del 100%. *Strobilurus esculentus* pertenece al filo Basidiomycota y quedó situado en un clado independiente al resto de cepas pertenecientes a los filos Ascomycota y Deuteromycota. De este grupo surgió un segundo clado principal, dividido a su vez en dos ramas. La rama inferior, con un índice de bootstrap del 97%, se dividió a su vez para formar por un lado los clados que abarcaron a *Alternaria* y *Embellisia* (bs. 100%) y por otro lado, los clados que englobaron a *Phoma*, *Peyronellaea* y *Epicoccum* (bs. 100%). El clado superior se ramificó para dar lugar a un grupo más pequeño formado por *Aureobasidium* (bs. 100%), y por otro lado a un segundo clado que abarcó a *Cladosporium*, *Beauveria*, *Penicillium* y *Aspergillus*.

Comenzando por la base del cladograma, las colonias de la cepa **H03-13** mostraron un diámetro de 2,6cm a los 7 días de crecimiento y de 4,3cm a los 15 días, siendo su color completamente blanco. La cepa **H03-04**, se localizó en el mismo clado que *Epicoccum nigrum*. A los 7 días el diámetro de las colonias era de 4,2cm y el color era blanco, mientras que a los 15 días el color pasó a ser verdoso con un aspecto lanoso, siendo más oscuro en el envés. El diámetro no aumentó en ese tiempo. Los conidióforos (hifas diferenciadas a partir de las cuales nacen los conidios) de *Epicoccum* se agruparon formando clusters compactos, denominados esporodoquios, que se pudieron observar directamente como puntos negros sobre la colonia a los 10 días de crecimiento. Los conidióforos fueron cortos y simples, de color marrón claro (Samson y col., 2004b). La cepa **H01-02** se incluyó en el mismo clado que *Peyronellaea glomerata*, sus colonias, de crecimiento rápido, mostraron un diámetro de 4,75cm a los 7 días y color blanco con el reverso de la colonia levemente marrón. A los 15 días tomó un color algo oliváceo y se extendió por toda la placa. Esta cepa formó picnidios (cuerpos fructíferos con forma de botella en el interior de los cuales se alojan los conidióforos) (Deng y col., 2011). La cepa **H01** se agrupó en el mismo clado que *Phoma medicaginis*, con hifas septadas, caracterizándose por la formación de picnidios con forma redondeada y color oscuro (las células conidiógenas se encuentran dentro del picnidio y producen conidios, esporas asexuales formadas desde el ápice o lateral de la hifa), unicelulares de forma elipsoide con varias cicatrices (Samson y col., 2004b). La cepa **H04** se incluyó en el mismo clado que *Embellisia eureka*. El grupo que englobó a *Embellisia eureka* fue abarcado a su vez, por otro clado cuya segunda rama se bifurcó para formar los clados que incluían a *Lewia infectoria*, *Lewia ethzedia* y *Alternaria oregonensis*. En este estudio, no pudo determinarse a cual de las dos especies, *L. infectoria* o *L. ethzedia* pertenecían las cepas aisladas.

Las especies **H01-05**, **H01-06**, **H03-01**, **H3** y **H3.12**, se incluyeron en el mismo clado que *Alternaria oregonensis*, tratándose posiblemente de la misma especie, mientras que las cepas **H02-09**, **H14**, **H15**, y **H05**, quedaron más próximas a *Lewia infectoria* y *L. ethzedia* (teleomorfos de *Alternaria infectoria* y *A. ethzedia*).

El análisis microscópico de *L.infectoria/L. ethzedia* no reveló la presencia de ascomas, pero si de conidios asexuales. *A. oregonensis*, *L. ethzedia* y *L. infectoria* formaron un clado independiente del clado formado por *A. alternata* y las cepas analizadas **H01-09**, **H02** y **H01-12** con un índice de bootstrap del 100%. Las colonias de *Alternaria*, de crecimiento rápido, presentaron por lo general un color grisáceo o marrón con micelio aéreo algodonoso de color de blanco a gris en AEM. El reverso de las colonias presentó un color marrón anaranjado. Al microscopio óptico se observaron conidióforos cortos y simples de color marrón claro, a partir de los cuales nacían los conidios. Los conidios formaron cadenas gracias a la presencia de conidióforos secundarios. De forma ovoide a elipsoide, en el caso de *A. alternata*, rugosos y pigmentados (color marrón) y con varios septos longitudinales y transversales (11-32µm de largo X 6-15µm de ancho) (Samson y col., 2004b; Simmons, 2007; Andersen y col., 2009).

Penicillium y *Aspergillus* formaron un único clado con un índice de bootstrap del 100% que a su vez se dividió en dos subclados, uno que se correspondió con cepas de los géneros *Aspergillus* y *Emericella* y el otro al género *Penicillium*.

En el cladograma, la cepa **H01-07** se localizó en el mismo clado que *Aspergillus terreus*, mientras que las cepas **H01-11**, **H03-02** y **H03-06** se agruparon en el mismo clado que *Aspergillus niger*. Las cepas de *Aspergillus* se caracterizaron por presentar conidióforos erectos y no ramificados cuando se observaron al microscopio óptico (el ápice del mismo forma una vesícula de la que pueden nacer directamente las fiálides, células especializadas que normalmente tienen forma de botella, o sobre células intermedias denominadas metulae)(Klich, 2002; Samson y col., 2004b; Samson y col., 2007). Las colonias de *Aspergillus niger*, se caracterizaron por presentar una base blanca y una capa densa de conidióforos negros sobre ella. Los conidios fueron globosos, marrones y ornamentados con arrugas irregulares y crestas. Las colonias de *Aspergillus terreus* fueron de color amarillo-marrón y los conidios de globosos a ovoides y transparentes (Klich, 2002; Samson y col., 2004b; Samson y col., 2007).

Las cepas **H03-05** y **H03-14** formaron un clado independiente que se unió al clado constituido por *Emericella nidulans*, teleomorfo de *Aspergillus nidulans*. El micelio de estas cepas fue blanco y sus conidios verde oscuros, esféricos y ligeramente rugosos. Produjeron cleistotecios globosos de color rojo o marrón oscuro, rodeados de células de Hülle subglobosas y de color amarillo opaco (Klich, 2002).

Las cepas de *Penicillium* presentaron un crecimiento por lo general rápido, su textura fue aterciopelada en la mayoría, lanosa y de color azul verdoso debido a la amplia densidad de conidióforos. El reverso fue de color beis y se fueron volviendo más oscuras con la edad. La cepa **H8**, sin embargo, produjo colonias blancas y estriadas, de color marrón claro en el envés. El tamaño de las colonias fue de 2 a 4.7cm a los 7 días de incubación en oscuridad. Los conidióforos fueron transparentes con un único estipe terminado en una espira de fiálides (monoverticilado) o en un penicilo. Los penicilos estaban formados por ramas (se denominan así a las células localizadas entre el estipe y el metula) y metula.

NJ tree

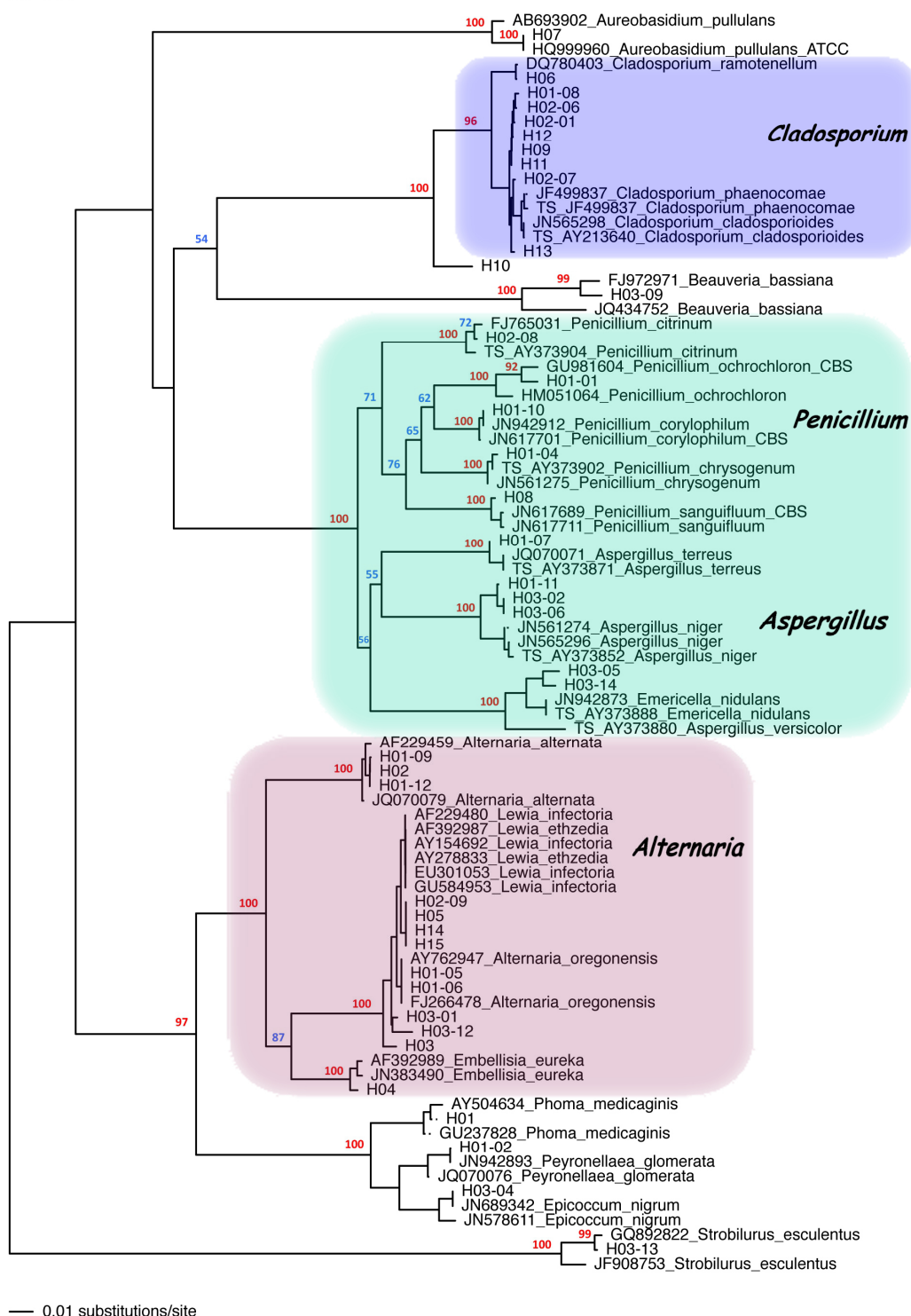


Figura 4.10. Árbol filogenético de las regiones ITS 2 y 3 y el gen de ARNr 5,8S de las cepas de hongos filamentosos seleccionadas del edificio de Madrid. TS:Type Strain (especie tipo). Se indican en rojo los índices de bootstrap superiores al 95% y en azul los comprendidos entre el 50 y el 94%.

Las fiálides mostraron forma de botella y los conidios, extruidos desde el cuello de la fiálide, fueron globosos o elipsoidales, algo verdosos, de pared lisa y formaron cadenas secas. Su tamaño fue de 4.5 a 5.0µm en diámetro (Samson y col., 2004a; Samson y col., 2004b).

En el cladograma, con un índice de bootstrap del 100%, la cepa **H02-08**, quedó localizada en el mismo clado que *Penicillium citrinum*; la cepa **H1.10**, se localizó junto a *Penicillium corylophilum*; la cepa **H01-01** quedó en el mismo clado que *Penicillium ochrochloron*; la cepa **H01-4** en el de *Penicillium chrysogenum* (figura 4.11) y la cepa **H8**, se incluyó junto a *P.sanguifluum*.

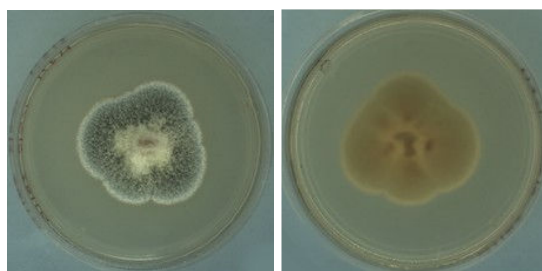


Figura.4.11. Colonia de *Penicillium chrysogenum* a los 7 días de crecimiento a 28°C en oscuridad.

La cepa **H03-09** se localizó en el mismo clado que *Beauveria bassiana* con un índice de bootstrap del 100%. Este clado se unió al cluster de *Cladosporium* con un índice de bootstrap del 54%. La cepa **H03-09**, produjo colonias algodonosas de color blanco con un envés de color blanco y marrón claro. El diámetro a los 7 días fue de 4,9cm. Las células conidiógenas formaron agrupaciones que se visualizaron como bolas en las hifas aéreas. Los conidios de *Beauveria bassiana* fueron hialinos, unicelulares y de forma globosa a ovoide. Las células conidiógenas se alargaron formando raquis denticulados describiendo un zigzag. Las hifas fueron septadas (Rehner y col., 2005).

Las colonias de *Cladosporium* se corresponden con el estado anamorfo (asexual) del hongo y su color fue oliváceo, aterciopelado y polvoroso, de crecimiento por lo general lento. Sus hifas vegetativas, conidióforos y conidios presentaron pigmentación marrón olivácea (Samson y col., 2004b). Al microscopio óptico pudo verse como los conidios, con forma de elipsoidal a ovalada, formaron cadenas ramificadas que se desarticulaban con facilidad (Ellis, 1971; Ellis, 1976; de Hoog y col., 2000; Dugan y col., 2004).

En el árbol, la cepa **H06** se agrupó en el mismo clado que *Cladosporium ramotenellum*, mientras que la mayoría de las cepas, desde la **H01-08** a la **H02-07**, se situaron más cercanas a otras especies del género, como son *C. phaenocomae* o *C. cladosporoides*.

La cepa **H10**, quedó sin identificar, situándose en un mismo clado que *Cladosporium*, con un índice de bootstrap del 100%.

La cepa **H07** se agrupó en el mismo clado que *Aureobasidium pullulans* con un índice de bootstrap del 100%. Las colonias de la cepa **H07**, fueron planas y húmedas, de un color verde oliváceo y se recubrieron por una masa mucosa de esporas. El diámetro a los 7 días fue de 3,3cm. Las hifas fueron septadas y de color marrón y los conidios, unicelulares, cilíndricos u ovoides (de Hoog, 1999; Samson y col., 2004b).

Con respecto al árbol formado con las secuencias de levaduras (figura 4.12), cabe destacar la presencia de dos clados principales pertenecientes a los filos Ascomycota, con una única cepa y Basidiomycota. La cepa **L10** (Basidiomycota) se agrupó en el mismo clado que *Candida* con un índice de bootstrap del 100%, presentando homología con *Candida valdiviana*. Las levaduras **L04**, **L08** y **L14**, formaron un solo clado junto con *Rhodotorula mucilaginosa* con un índice de bootstrap del 100%. Por último, las cepas **L13** y **L05**, se localizaron en el mismo clado que *Cryptococcus*, con un índice de bootstrap del 100%. **L15** se agrupó el mismo clado que *Cryptococcus magnus* y **L13** se agrupó con *Cryptococcus saitoi*.

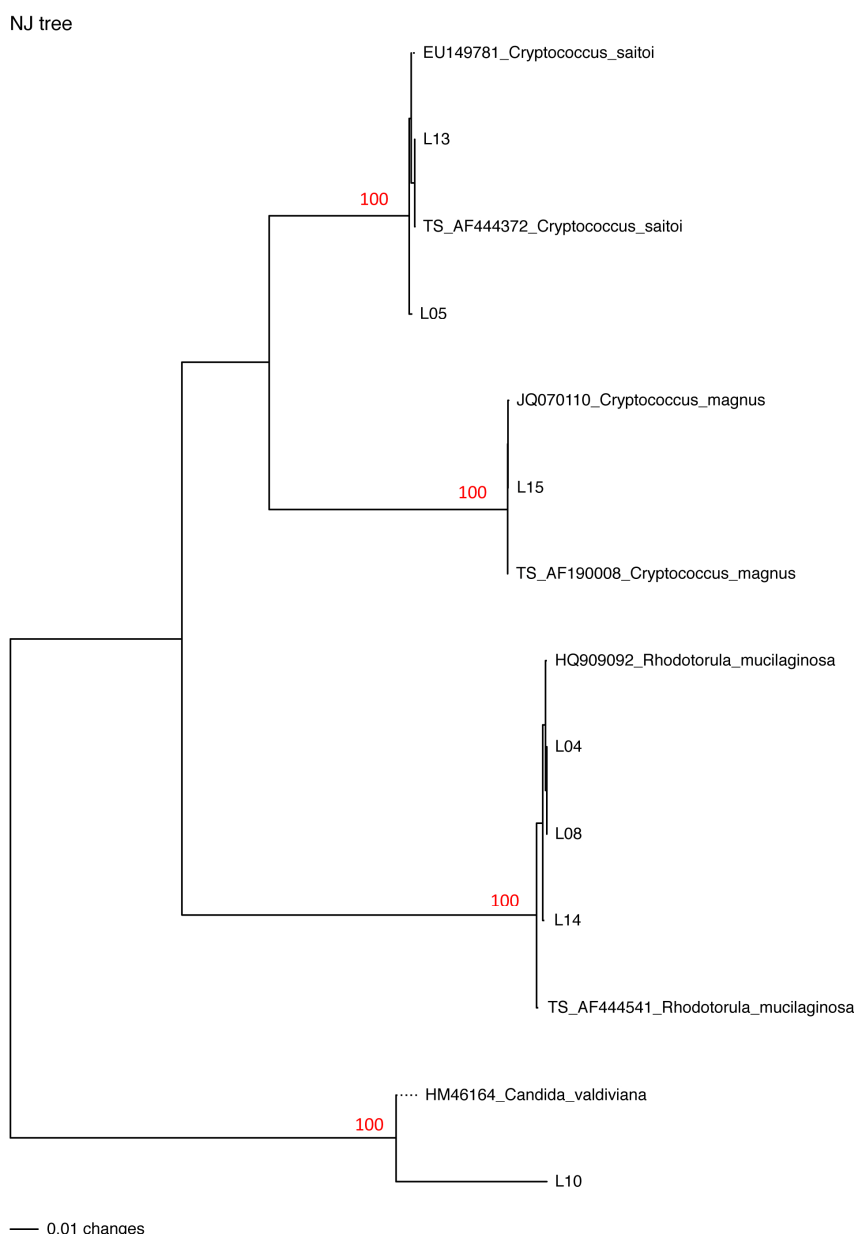


Figura 4.12. Árbol filogenético consenso de la región ITS de las cepas de levaduras seleccionadas del edificio de Madrid. TS: Type Strain (especie tipo). Se indican en rojo los índices de bootstrap superiores al 95% y en azul los comprendidos entre el 50 y el 94%.

4.2. COMPARACIÓN DE TRES MUESTREADORES POR IMPACTO EN PLACA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS EN AIRE INTERIOR.

Se compararon tres muestreadores de aire por impacto en placa comerciales: DUO SAS SUPER 360, SAMPL'AIR y SPIN AIR V2 en condiciones reales (Sánchez-Muñoz y col., 2012). El objetivo del estudio fue conocer si los resultados de Unidades Formadoras de Colonia obtenidos con diferentes muestreadores que se estaban utilizando en el mercado, en las mismas condiciones, eran comparables. Las características de los muestreadores, así como la metodología del ensayo, están descritas en el apartado 3.3.2.

Se llevaron a cabo dos experimentos en los que se encendieron simultáneamente los siguientes equipos:

- Dos muestreadores DUO SAS SUPER 360 y dos muestreadores SPIN AIR sin rotación (master con su esclavo conectado).
- Dos muestreadores DUO SAS SUPER 360 (nombrados como SAS-1 y SAS-2 de aquí en adelante) y un muestreador SAMPL'AIR.

4.2.1. SPIN AIR V2-DUO SAS SUPER 360 (A.)

Ambos muestreadores disponen de dos cabezales, lo que permite comparar mejor los resultados (figura 4.13).



Figura 4.13. Muestreador DUO SAS SUPER 360 Y SPIN AIR.

Muestreador	Media (UFC/m ³)	Desviación estándar	Error estándar
SAS-1 izdo	70	59.0	19.6
SAS-1 dcho	60	38.1	12.7
SAS-2 izdo	55	18.2	6.1
SAS-2 dcho	56	30.1	10.0
SAMPL'AIR	54	16.1	5.4

Tabla 4. 3. Valores medios de UFC/m³ de bacterias obtenidos simultáneamente con dos DUO SAS SUPER 360 y un SPIN AIR con su esclavo.

Para un mismo volumen de aire, se recogieron mayor número de UFC/m³ con el muestreador SPIN AIR que con los muestreadores SAS. Los dos cabezales del SPIN AIR funcionaron bien conjuntamente. La concentración media más baja, se obtuvo con el muestreador SAS-2. Las desviaciones estándar y los errores estándar fueron alrededor de 3-4 veces mayores para los muestreadores SAS que para el muestreador SPIN AIR. Los resultados fueron más variables cuando se utilizaron los muestreadores SAS (tabla 4.3). La

prueba Shapiro-Wilk (tabla 4.4) mostró que únicamente los datos recogidos con el cabezal derecho del muestreador SAS-2 no seguían una distribución normal (Sig.<0.05).

En la figura 4.14 se muestra el diagrama de cajas de los valores de UFC/m³ de todos los cabezales empleados en el experimento, del que puede extraerse información relativa a la dispersión de los datos y tipo de simetría.

Muestreador	Shapiro-Wilk UFC/m ³	
	Estadístico	Significación
SAS-1 izdo	0.983	0.976
SAS-1 dcho	0.976	0.944
SAS-2 izdo	0.952	0.714
<u>SAS-2 dcho</u>	<u>0.806</u>	<u>0.024</u>
IUL master	0.913	0.335
IUL esclavo	0.945	0.634

Tabla 4.4. Valores del estadístico y valor de significación de la prueba Shapiro-Wilk en el ensayo de comparación de muestreadores.

Experimento A.

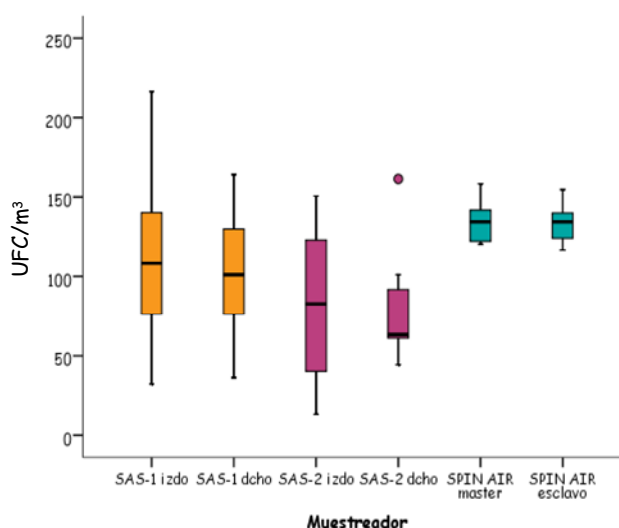


Figura 4.14. Diagrama de cajas de los valores de UFC/m³ obtenidos en el experimento A.

Al comparar la distribución de los datos de UFC/m³ entre los cabezales de cada muestreador SAS, se observó que eran más parecidas para el muestreador SAS-1 que para el muestreador SAS-2. Para ambos muestreadores, la dispersión fue mayor en el caso del cabezal izquierdo. El cabezal derecho del SAS-2 presentó además un caso atípico y una asimetría positiva. La distribución de los datos del muestreador SPIN AIR fue similar para ambos cabezales y la dispersión de los datos fue menor que la del resto de cabezales. Las medianas de los datos de UFC/m³ fueron mayores para este muestreador.

Se analizó la homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene, resultando un nivel crítico de 0.002, por lo que se pudo asumir que las varianzas de las muestras no eran iguales. La prueba Kruskal-Wallis mostró que las medias de los datos de UFC/m³ recogidas

por los distintos cabezales, no podían considerarse iguales (Sig.=0.019). Con el fin de evaluar que medias diferían entre si exactamente, se llevaron a cabo comparaciones por pares utilizando la prueba de Mann-Whitney. Se realizaron 15 comparaciones mediante esta prueba y se concluyó que los cabezales que diferían estadísticamente en sus datos de UFC/m³ medios (sig.=0.005) eran el cabezal derecho del muestreador SAS-2 con los dos cabezales del muestreador SPIN AIR (master y esclavo).

Al analizar los datos de los muestreadores SAS por separado, se vio que las varianzas eran homogéneas (prueba Levene, sig.=0.157) y aplicando la prueba de Kruskal Wallis para estos cuatro cabezales, se observó que las medias no podían considerarse estadísticamente diferentes (sig.=0.351), a pesar de que los valores tomados con el muestreador SAS-2 eran menores. Se calculó el logaritmo de los valores de UFC/m³ y se representaron los nueve valores del logaritmo de la concentración de bacteria, obtenidos con cada uno de los cabezales, de los muestreadores SAS y SPIN AIR (tres repeticiones por tres posiciones). En la figura 4.15 se puede observar que los datos procedentes del SPIN AIR de los dos cabezales coinciden perfectamente en la diagonal mientras que los datos de los muestreadores SAS son algo más dispersos.

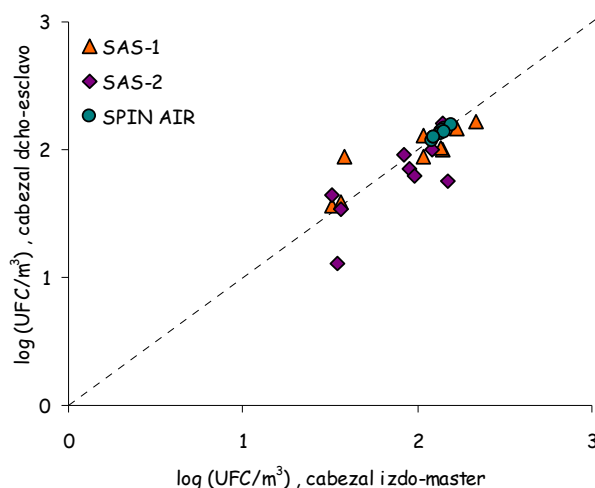


Figura 4.15. Diagrama de dispersión de los datos de log (UFC/m³) de los cabezales derecho e izquierdo de los muestreadores SAS y del master y esclavo del muestreador SPIN AIR del experimento A.

4.2.2. SAMPL'AIR -DUO SAS SUPER 360 (B.)

En este caso se compararon dos muestreadores SAS de doble cabezal con un muestreador, SAMPL'AIR de un solo cabezal (experimento B.)

Muestreador	Media (UFC/m ³)	Desviación estandar	Error estandar
SAS-1 izdo	70	59.0	19.6
SAS-1 dcho	60	38.1	12.7
SAS-2 izdo	55	18.2	6.1
SAS-2 dcho	56	30.1	10.0
SAMPL'AIR	54	16.1	5.4

Tabla 4.5. Valores medios de UFC/m³ de bacterias obtenidos simultáneamente con dos DUO SAS SUPER 360 y un SAMPL'AIR.

El número de UFC/m³ recogidas por los muestreadores SAMPL'AIR y DUO SAS fueron similares (tabla 4.5). El número de UFC/m³ más elevado, se consiguió con el cabezal izquierdo del muestreador SAS-1 con 70.4 UFC/m³. La desviación estándar y el error estándar de los datos recogidos también fue mayor para este cabezal.

Se llevó a cabo la prueba Shapiro-Wilk (tabla 4.6), para ver el tipo de distribución que seguían los datos. Las distribuciones de las 9 muestras tomadas con los dos cabezales del muestreador SAS-1 y las recogidas con el SAMPL'AIR, no seguían una distribución normal (Sig<0.05) por lo que se calculó el logaritmo de los datos de UFC/m³ y volvió a realizarse la prueba Shapiro-Wilk con estos datos. Se comprobó que los datos de Log (UFC/m³) de todos los muestreadores seguían una distribución log-normal. Al representar los diagramas de cajas de los datos de UFC/m³ tomadas con cada cabezal se observó que exceptuando el cabezal derecho del SAS-2, las distribuciones presentaban casos extremos, atípicos o ambos. La distribución de los valores de UFC/m³ de los muestreadores SAS-1 y SAMPL'AIR mostraron asimetría positiva. En este experimento los valores de las medianas fueron parecidos para todos los muestreadores (figura 4.16).

Muestreador	Shapiro-Wilk	
	Estadístico	Significación
<u>SAS-1 izdo</u>	<u>0.633</u>	<u>0</u>
<u>SAS-1 dcho</u>	<u>0.731</u>	<u>0.003</u>
SAS-2 izdo	0.929	0.469
SAS-2 dcho	0.948	0.673
<u>SAMPL'AIR</u>	<u>0.811</u>	<u>0.027</u>

Tabla 4.6. Valores del estadístico y valor de significación de la prueba Shapiro-Wilk en el experimento B.

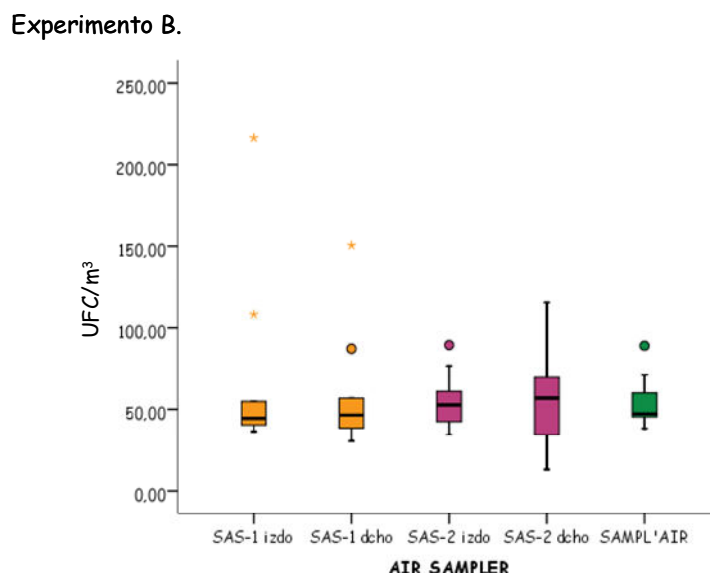


Figura 4.16. Diagrama de cajas de los valores de UFC/m³ obtenidos en el experimento B.

La prueba Levene con la que se contrastó la homocedasticidad confirmó que podía asumirse que las varianzas de los datos eran iguales (Sig.= 0.100) y la prueba Kruskal-Wallis

indicó que las medias de los valores de UFC/m³ recogidos con los diferentes muestreadores podían considerarse iguales también (Sig.=0.989).

Para visualizar la diferencia de funcionamiento de los cabezales derecho e izquierdo, se representó el log (UFC/m³) de cada cabezal enfrentado (figura 4.17).

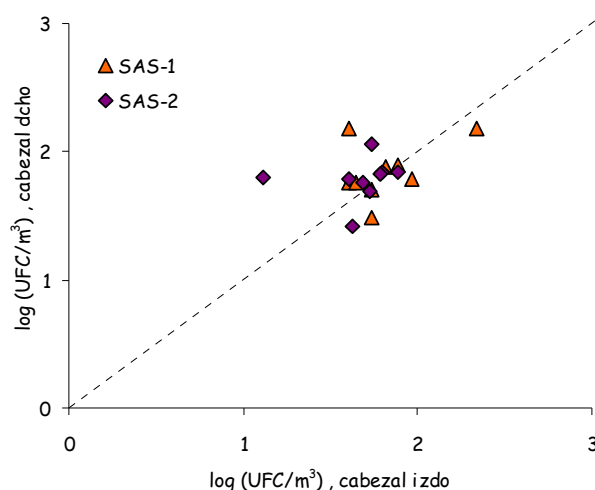


Figura 4. 17. Diagrama de dispersión de los datos de logUFC/m³ de los cabezales derecho e izquierdo de los muestreadores SAS del experimento B.

4.2.3. SPIN AIR -DUO SAS SUPER 360- SAMPL'AIR (A.-B.)

En la figura 4.18 se representa la media de los datos de UFC/m³ de los dos cabezales de los muestreadores SAS (derecho e izquierdo) y SPIN AIR (master y esclavo) y de los dos muestreadores SAS (1 y 2) entre si, para los dos experimentos A y B. Se calculó también el coeficiente de variación para cada uno de ellos. El muestreador SPIN AIR recogió los mayores valores de UFC/m³, mientras que el error y el coeficiente de variación (CV) fueron los menores. El muestreador SAS, fue el que presentó los CV más elevados.

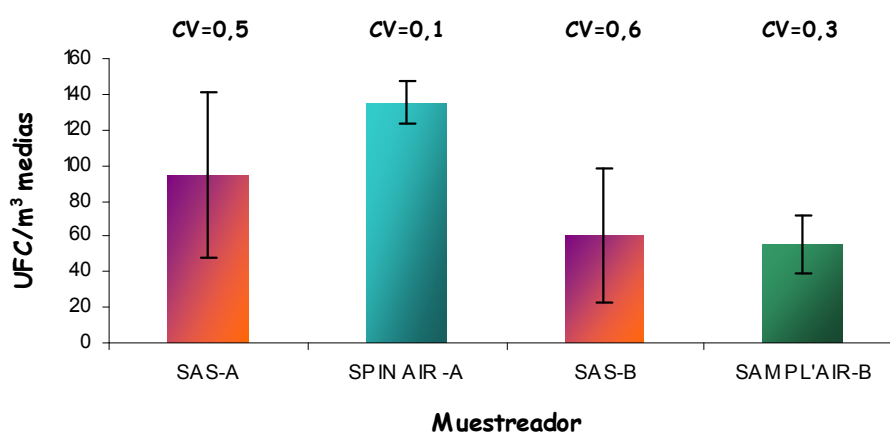


Figura 4.18. Valores medios de UFC/m³ de bacteria obtenidos con los tres modelos de muestreadores en todos los experimentos y su coeficiente de variación.

4.3 CARACTERIZACIÓN ESTACIONAL DE BIOAEROSOLES EN DOS EDIFICIOS DE DIFERENTE EDAD EN MADRID.

Con el objetivo de completar el estudio realizado inicialmente en los edificios bioclimáticos con un método de muestreo volumétrico, se escogió el edificio de Madrid para un segundo muestreo utilizando dos muestreadores DUO SAS SUPER 360. A pesar de que se había comprobado anteriormente que los muestreadores SPIN AIR eran más eficientes que los muestreadores DUO SAS SUPER 360 dado que eran capaces de recolectar un mayor número de UFC por metro cúbico, además de mostrar menor dispersión en sus medidas, con el tiempo mostraron errores eléctricos que imposibilitaron su uso en ensayos posteriores. En esta ocasión se tomaron muestras durante todas las estaciones de un año, teniendo en cuenta las limitaciones de los muestreadores, para así comprobar las fluctuaciones en las UFC/m³ de hongos y bacterias de aire interior y exterior que tenían lugar. Además se llevó a cabo un estudio paralelo, en un edificio próximo, más antiguo, con el objetivo de comparar dichas variaciones entre dos edificios con la misma localización geográfica pero de diferente edad (apartado 3.5.3. de la metodología).

4.3.1. Resultados de UFC/m³ de bacterias

Una vez incubadas las placas, se llevó a cabo el conteo y corrección del número de colonias de cada placa (apartado 3.3.3). En las siguientes tablas, 4.7 y 4.8 se muestran los valores medios de UFC/m³, calculados para cada edificio, por estación, así como otros estadísticos descriptivos como la mediana, la desviación estándar y el máximo y mínimo número de UFC/m³. La tabla 4.7, se corresponde con valores procedentes de muestras interiores mientras que la tabla 4.8, se ha calculado con los valores de UFC/m³ procedentes de muestras tomadas en el exterior.

UFC/m ³ bacterias	Invierno		Primavera		Verano		Otoño	
Interior	E.A.	E.M.	E.A.	E.M.	E.A.	E.M.	E.A.	E.M.
Media	85	43	147	84	331	160	475	104
Mediana	72	39	136	43	247	107	225	73
DE	53.4	21.5	92.3	97.5	234.1	126.0	789.4	89.3
Mínimo	19	15	58	7	65	50	77	13
Máximo	168	87	385	289	768	429	2702	306
N	20	16	20	16	20	16	20	16

Tabla 4.7. Estadística descriptiva de los valores de UFC/m³ de bacterias en el interior del edificio antiguo (E.A.) y del edificio moderno (E.M.). DE (desviación estándar) y N (número de muestras).

UFC/m ³ bacterias	Invierno		Primavera		Verano		Otoño	
Exterior	E.A.	E.M.	E.A.	E.M.	E.A.	E.M.	E.A.	E.M.
Media	758	15	103	33	114	68	255	236
Mediana	758	15	103	33	114	68	255	236
DE	711	16.2	59.7	0.7	26.16	9.19	70	61.52
Mínimo	255	4	62	33	96	62	206	193
Máximo	1261	27	145	33	133	75	305	280
N	4	4	4	4	4	4	4	4

Tabla 4. 8. Estadística descriptiva de los valores de UFC/m³ de bacterias en el exterior del edificio antiguo (E.A.) y del edificio moderno (E.M.).

Como puede observarse en la tabla 4.7, la media de los niveles de UFC/m³ interiores de bacterias fueron siempre superiores en el edificio antiguo, de hecho, en otoño llegó a cuadruplicar el valor del edificio moderno. Los valores medios exteriores se comportaron de la misma manera, exceptuando precisamente la estación de otoño, en la que las medias de las UFC/m³ fueron más parecidas entre edificios. Las diferencias de UFC/m³ interiores de bacterias entre los dos edificios, fueron significativas para las estaciones de invierno (Sig.=0.043) y otoño (Sig.=0.010) (apartado 3.7).

Para cada edificio, las diferencias de UFC/m³ medias entre estaciones fueron significativas entre el invierno y el verano (edificio antiguo, Sig.=0.009; edificio moderno, Sig.=0.034) y entre el invierno y el otoño (edificio antiguo, Sig.=0.002; edificio moderno, Sig.=0.046). En el edificio antiguo, además hubo diferencias significativas entre la primavera con las mismas estaciones (verano, Sig.=0.013; otoño, Sig.=0.034).

Las desviaciones estándar de los datos obtenidos en los distintos puntos de muestreo interiores, exceptuando la primavera, fueron mayores para el edificio antiguo, sobre todo en otoño, puesto que se produjeron niveles muy elevados en uno de sus pasillos. En el exterior, hubo mayor variabilidad entre muestras en el edificio antiguo (tabla 4.7 y tabla 4.8).

En el interior del edificio antiguo, el mínimo número de UFC/m³ detectadas coincidió para todas las estaciones con las muestras tomadas en la biblioteca, exceptuando la estación de verano, en el que el mínimo se detectó en un laboratorio del sótano. Sin embargo, el máximo número de UFC/m³ no coincidió en ninguna de las estaciones, detectándose en pasillos de plantas diferentes en otoño y verano, en un baño en primavera y en el laboratorio de la segunda planta en invierno (figura 4.19).

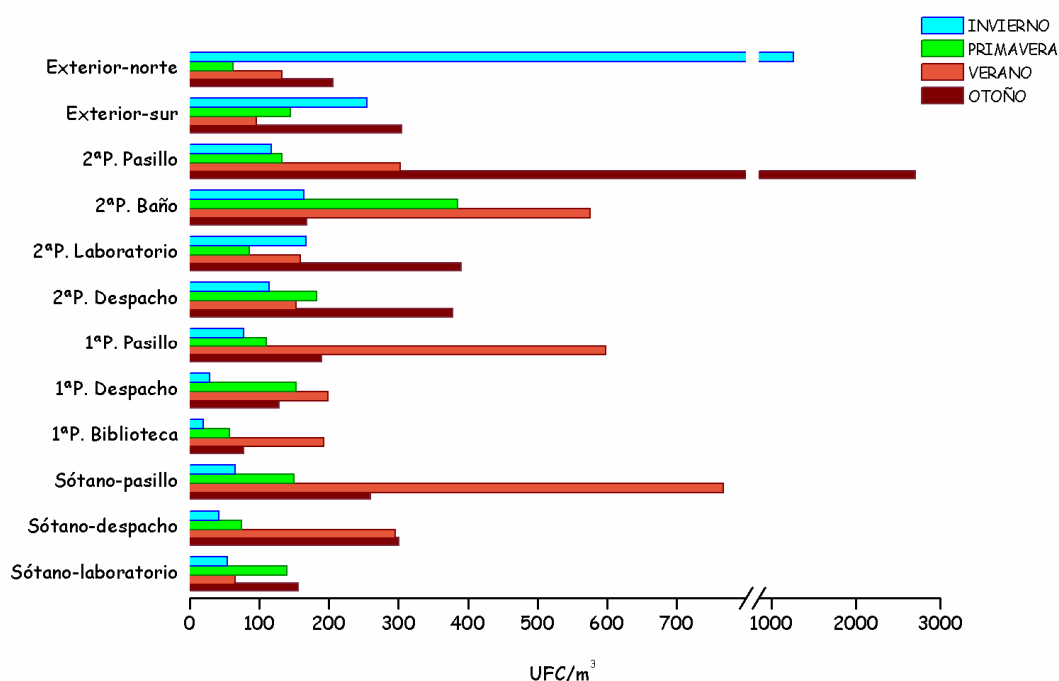


Figura 4. 19. UFC/m³ de bacterias en los distintos puntos de muestreo del edificio antiguo

En el interior del edificio moderno, el mínimo número de UFC/m³ se produjo en la sala blanca, en otoño, en un despacho de la primera planta en primavera y en un laboratorio de la

segunda planta en verano. Los máximos niveles de bacterias coincidieron en todas las estaciones, excepto el invierno, en el pasillo de la primera planta (figura 4.20).

Mediante la prueba Shapiro-Wilk (apartado 3.7) se comprobó que los datos de UFC/m³ interiores del edificio antiguo seguían una distribución normal en las estaciones de invierno (Sig.=0.360) y verano (Sig.= 0.113). Al aplicarse la prueba al logaritmo de los datos de UFC/m³, se comprobó que los datos de las estaciones de primavera (Sig.=0.688) y otoño (Sig.=0.081) seguían una distribución log-normal. Las medianas de la distribución de los datos de UFC/m³ interiores en el edificio antiguo (figura 4.21), fueron algo superiores en verano y otoño, siendo además la dispersión de los datos, mayor en estas estaciones. Las distribuciones de la primavera, verano y otoño presentaron asimetría positiva. En primavera y otoño, además, se produjo un valor extremo. El valor de la mediana del conjunto de muestras exteriores tomadas en invierno fue considerablemente mayor que la del resto de diagramas de cajas. Exceptuando este caso, las medianas de las distribuciones de muestras exteriores se encontraron próximas a la mediana de las muestras tomadas en el interior.

Para el edificio moderno, la distribución de los datos fue normal, como en el edificio antiguo, para las estaciones de invierno (Sig.=0.357) y verano (Sig.=0.051). Al aplicar el logaritmo se comprobó que las estaciones de primavera (Sig.=0.884) y otoño (Sig.=0.474) también seguían una distribución log-normal.

Como en el edificio antiguo, las medianas de los datos de UFC/m³ interiores fueron mayores en verano y otoño, presentando el verano el mayor valor. Las distribuciones de los valores de UFC/m³ mostraron asimetría positiva en todas las estaciones, y exceptuando la primavera, presentaron un valor atípico. Además, las distribuciones de las muestras tomadas en primavera y verano tuvieron mayor dispersión que las otras dos estaciones. Las medianas de los valores exteriores aumentaron escalonadamente desde el invierno hasta el otoño, presentando el valor de la mediana de la distribución de otoño un valor mucho más elevado que el resto.

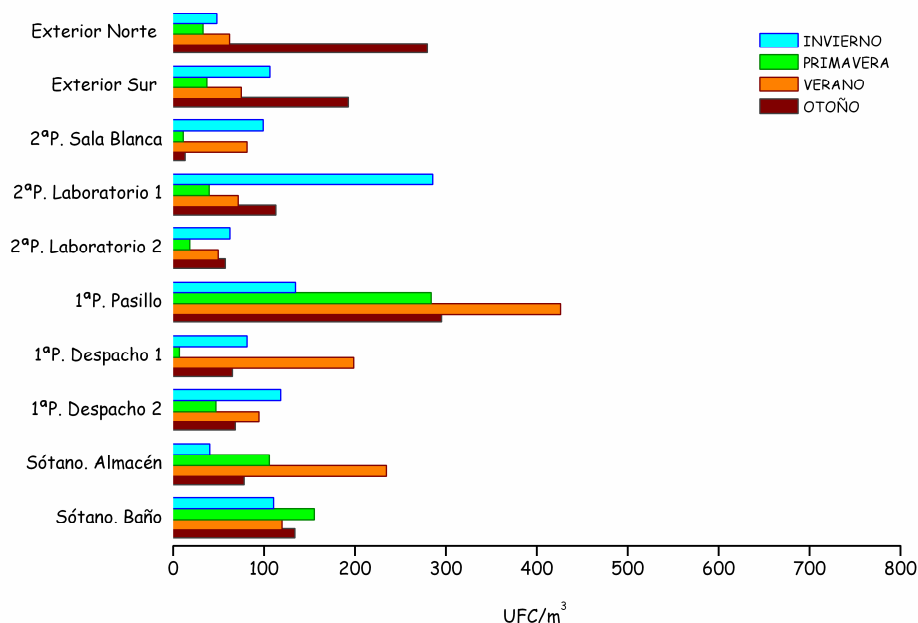


Figura 4.20. UFC/m³ de bacterias en los distintos puntos de muestreo del edificio moderno.

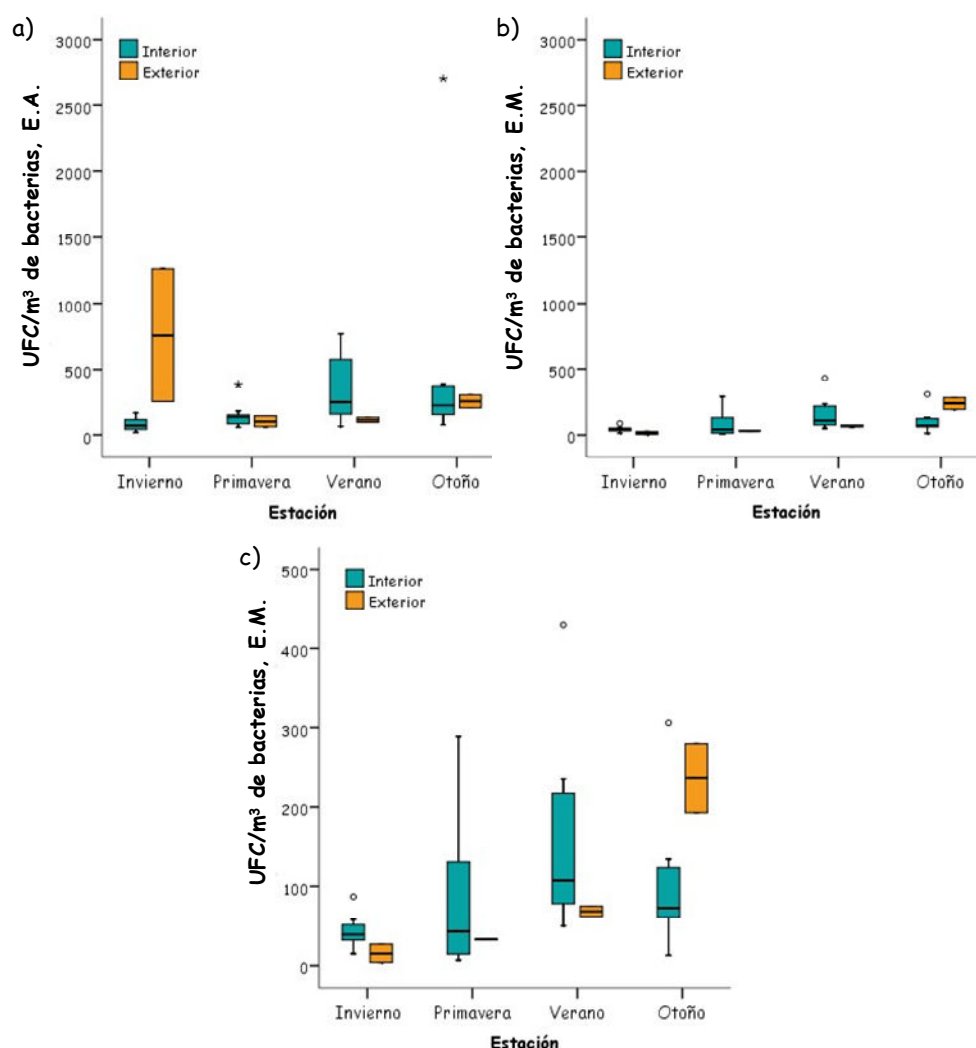


Figura 4.21. Diagrama de cajas por estación de los datos de UFC/m³ de bacterias en el interior y exterior del a) edificio antiguo, b) edificio moderno c) edificio moderno a menor escala. Cada caja indica el 50% de los datos centrales y está limitada por los percentiles 25 y 75 (bisagras de Tukey). La barra central indica el valor de la mediana. Las líneas verticales indican por arriba, el valor máximo y por debajo de la caja, el valor mínimo que no llega a ser atípico. Los casos extremos están representados por estrellas y casos atípicos están representados por círculos.

4.3.2. Correlación de las UFC/m³ de bacterias con la temperatura, humedad relativa y UFC/m³ de hongos.

En el edificio antiguo, los datos de UFC/m³ de bacterias correlacionaron en la estación de invierno negativamente con los valores de temperatura, tomada en los distintos puntos de muestreo (coeficiente de correlación de Pearson (r)=-0.678, Sig.=0.045) y positivamente con las UFC/m³ de hongos (r =0.755, Sig.=0.012). En la estación de verano hubo correlación positiva entre las UFC/m³ de bacterias y las UFC/m³ de hongos (r =0.875, Sig.= 0.001).

En el caso del edificio moderno, únicamente hubo correlación positiva con los valores de UFC/m³ de hongos en primavera (coeficiente de correlación de Spearman=0.905, Sig.= 0.002).

4.3.3. Resultados de UFC/m³ de hongos.

En las siguientes tablas, 4.9 y 4.10, se muestran los valores medios de UFC/m³ de hongos de las muestras tomadas en el interior y exterior (respectivamente) junto a otros valores estadísticos calculados para cada edificio y estación.

UFC/m ³ hongos	Invierno		Primavera		Verano		Otoño	
Interior	E.A.	E.M.	E.A.	E.M.	E.A.	E.M.	E.A.	E.M.
Media	61	13	1407	40	116	42	129	26
Mediana	61	14	1246	21	87	27	128	14
DE	34,1	8,2	1148,2	46,8	84,3	46,8	95,3	28,8
Mínimo	16	0	166	4	31	15	20	7
Máximo	112	23	2702	141	290	156	354	95
N	20	16	20	16	20	16	20	16

Tabla 4.9. Estadística descriptiva de los valores de UFC/m³ de hongos en el interior del edificio antiguo (E.A.) y edificio moderno (E.M.).

UFC/m ³ hongos	Invierno		Primavera		Verano		Otoño	
Exterior	E.A.	E.M.	E.A.	E.M.	E.A.	E.M.	E.A.	E.M.
Media	1781	51	415	132	197	166	324	200
Mediana	1781	51	415	132	197	166	324	200
DE	454	7.1	87.7	36.8	3.5	6.4	48.8	14.1
Mínimo	1460	46	353	106	195	162	290	190
Máximo	2102	56	477	158	200	171	359	210
N	4	4	4	4	4	4	4	4

Tabla 4.10. Estadística descriptiva de los valores de UFC/m³ de hongos en el exterior del edificio antiguo (E.A.) y edificio moderno (E.M.).

Como ocurrió en el caso de bacterias, los valores medios de UFC/m³ en las cuatro estaciones, fueron mayores en el edificio antiguo que en el edificio moderno, tanto en el interior como en el exterior, llegando a ser en el interior hasta 35 veces mayor en primavera y 5 veces mayor en otoño. Las diferencias entre los niveles exteriores entre edificios fueron menos acusados en verano y más en invierno donde los niveles exteriores fueron 35 veces mayores que los niveles exteriores del edificio moderno. De hecho, las diferencias en las medias de UFC/m³ de hongos interiores entre los dos edificios fueron significativas en todas las estaciones (invierno, Sig.=0.001; primavera, Sig.=0.000; verano, Sig.=0.006; otoño, Sig.=0.003).

En la estación de invierno, en el edificio antiguo, las diferencias en las medias de UFC/m³ interiores fueron significativas con la estación de primavera (Sig.=0.000) y de otoño (Sig.= 0.048). En este caso, en la estación de primavera hubo diferencias significativas con el verano y el otoño (Sig.=0.000). En el edificio moderno, las diferencias entre las medias de las UFC/m³ fueron significativas únicamente entre las estaciones de invierno y verano (Sig.=0.007). La desviación estándar de los datos tomados en los diferentes puntos de muestreo interiores fue superior también para el edificio antiguo, siendo hasta 24 veces mayor en primavera (tabla 4.9.). En el exterior la desviación estándar fue también superior para este edificio, en todas las estaciones excepto el verano (tabla 4.10).

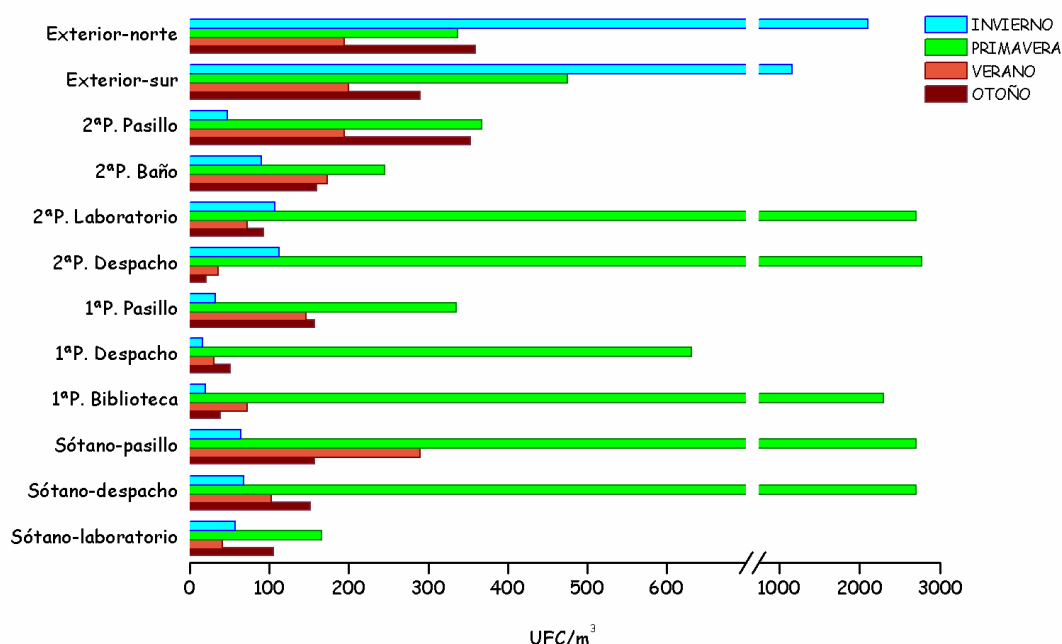


Figura 4.22. UFC/m³ de hongos en los distintos puntos de muestreo del edificio antiguo.

El mínimo número de UFC/m³ coincidió en invierno y verano en un despacho de la planta primera del edificio antiguo. El número máximo no coincidió en ninguno de los puntos de muestreo en ninguna de las estaciones. Curiosamente, en un despacho de la segunda planta se produjo el mínimo número de UFC/m³ en otoño y el nivel máximo en invierno y primavera. En invierno, los niveles exteriores fueron muy elevados, presentando un máximo de 2102 UFC/m³. Sin embargo, niveles exteriores tan altos, no volvieron a repetirse en ninguno de los muestreos restantes. En primavera, 5 de los puntos interiores presentaron niveles interiores muy elevados, superando incluso 4 de ellos las 2000 UFC/m³ (figura 4.22).

En el caso del edificio moderno, el mínimo nivel de UFC/m³ de hongos en el interior no coincidió en ninguna de las estaciones en ningún punto muestreado. Sin embargo, el máximo nivel se produjo en todas las estaciones excepto el invierno en el pasillo de la primera planta (figura 4.23).

En el edificio antiguo, en verano, coincidió el máximo de UFC/m³ de bacterias con el de hongos en el pasillo del sótano. En primavera coincidieron en el edificio moderno el máximo de UFC/m³ de hongos, en el pasillo de la primera planta, y el mínimo en un despacho de la misma planta. En verano volvieron a coexistir ambos niveles, produciéndose el máximo en el pasillo de la primera planta, y el mínimo en un laboratorio de la segunda planta. En otoño el máximo nivel de bacterias y hongos, se produjo nuevamente, en el pasillo.

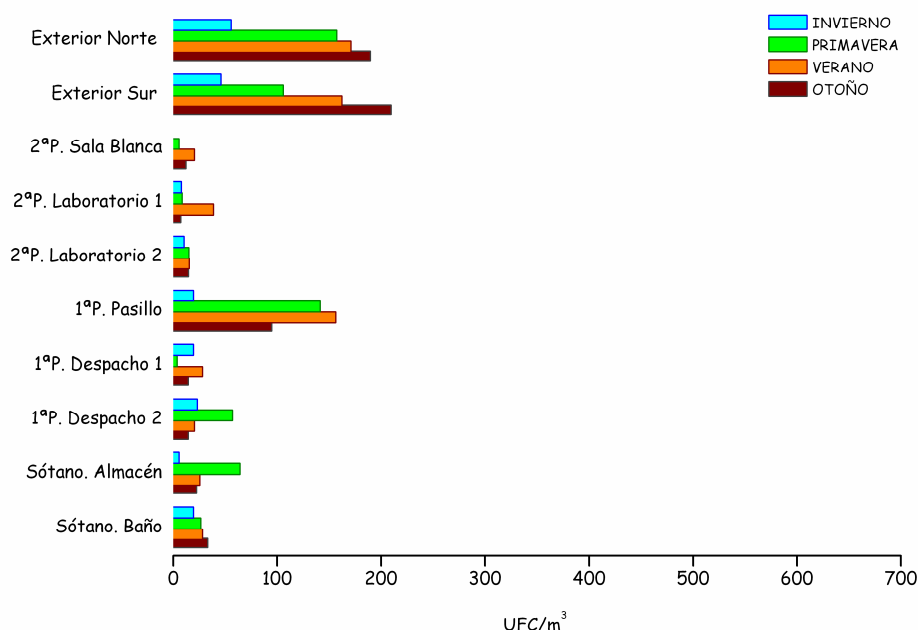


Figura 4.23. UFC/m³ de hongos en los distintos puntos de muestreo del edificio moderno.

		T media (°C)		HR media (%)	
		Interior	Exterior	Interior	Exterior
Ed. antiguo	Invierno	22	8	29	78
	Primavera	25	22	27	22
	Verano	28	30	28	22
	Otoño	22	9	30	25
Ed. moderno	Invierno	22	7	24	40
	Primavera	24	23	29	19
	Verano	26	29	38	34
	Otoño	22	16	27	35

Tabla 4.11 Temperatura y humedad relativa interior y exterior en los cuatro muestreos realizados en el edificio antiguo y el edificio moderno.

Durante el año en el que se desarrollaron los muestreos, en el edificio antiguo, la temperatura se mantuvo en el interior entre 21 y 29°C y en el exterior entre 8 y 33°C. La humedad relativa osciló entre el 24 y el 39% en el interior y en el exterior entre el 19 y el 78%. En el edificio moderno, la temperatura interior tuvo un mínimo de 19°C y un máximo de 27°C, mientras que la exterior se mantuvo entre 7°C y 29°C durante todos los muestreos. La humedad relativa osciló entre el 20 y el 44% en el interior y el 19 y el 40% en el exterior (tabla 4.11).

La prueba Shapiro-Wilk indicó que la distribución de los datos de UFC/m³ de hongos del edificio antiguo, seguía una distribución normal en invierno (Sig.=0.592), verano (Sig.=0.200) y otoño (Sig.=0.072).

En el edificio antiguo, la dispersión de los datos de UFC/m³ interiores fue mucho mayor en primavera, quedando la mediana de la distribución en dicha estación muy por encima del resto de estaciones. Las distribución presentó asimetría positiva en esta estación. En el resto de estaciones, las medianas fueron más parecidas, presentando la distribución de

otoño un valor atípico. La mediana de la distribución de UFC/m³ exterior fue muy superior en la estación de invierno a la mediana de los valores interiores. En verano y otoño, presentaron valores algo superiores a las medianas de los datos interiores, mientras que en primavera, el valor exterior fue considerablemente menor al interior (figura 4.24.a).

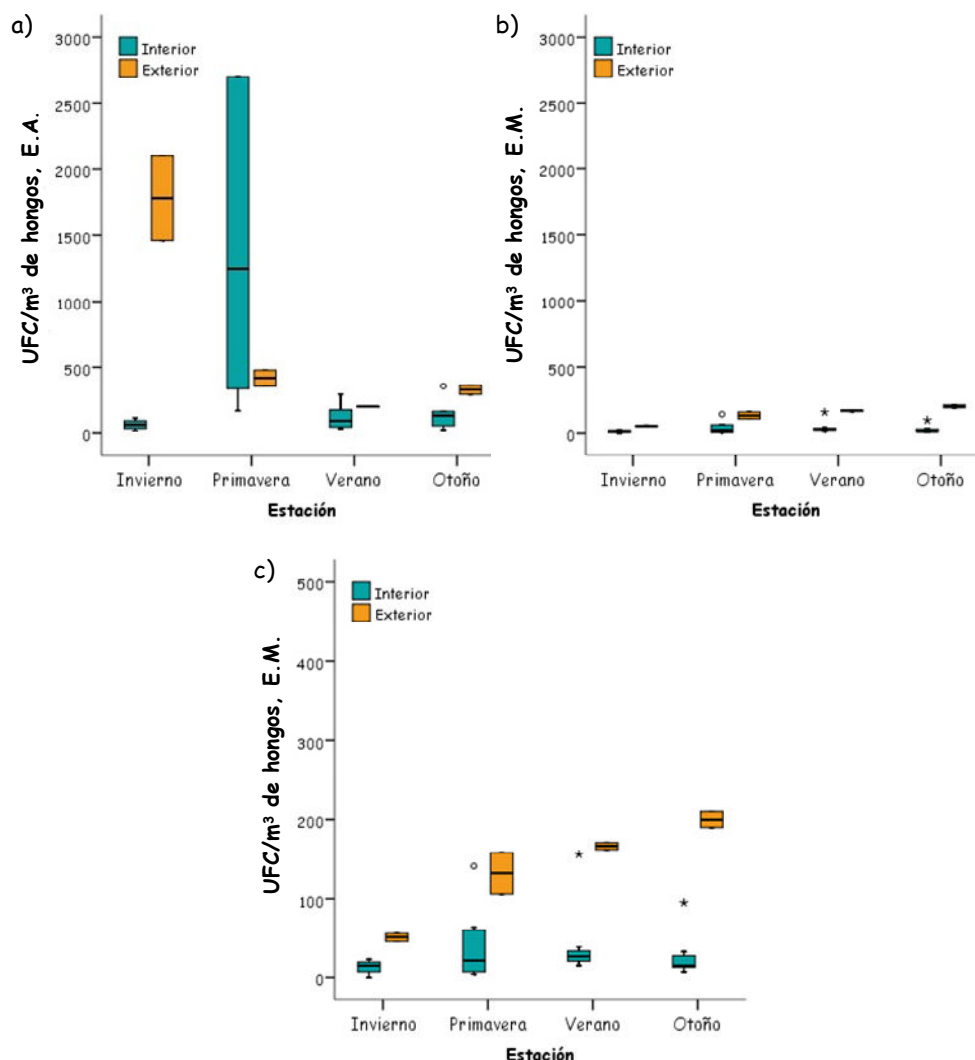


Figura 4.24. Diagrama de cajas por estación de los datos de UFC/m³ de hongos en el interior y exterior de los edificios a) edificio antiguo , b) edificio moderno y c) edificio moderno a menor escala.

En el edificio moderno, la distribución de los datos fue normal únicamente en la estación de invierno (Sig.=0.376). En primavera (Sig.=0.800) y otoño (Sig.=0.227), los datos siguieron una distribución log-normal (figura 4.24.b). Las medianas de los valores de UFC/m³ fueron bastante parecidas para los datos interiores, siendo ligeramente más elevada la correspondiente a los valores de verano. Las distribuciones de los valores interiores presentaron asimetría positiva en primavera, verano y otoño. Además en primavera hubo un caso atípico y en verano y otoño un caso extremo. Las medianas de los datos exteriores fueron aumentando escalonadamente a lo largo del año y siempre fueron superiores a las medianas de los valores interiores, presentándose el mayor valor en otoño.

4.3.4. Relación Interior/Exterior (I/E) de hongos y bacterias

En el edificio antiguo, en invierno, todos los puntos cumplieron la norma 171330-2 tanto para hongos como para bacterias, no ocurriendo lo mismo en el resto de estaciones (apartado 3.3.4.)(UNE 171330-2, 2009a).

En primavera, en el muestreo de bacterias, la relación de UFC/m³ I/E fue superior a 1.75 en un despacho y en el pasillo de la primera planta. Sin embargo, en el muestreo de hongos, 8 de los 10 puntos interiores muestreados, incumplieron esta norma.

En verano, fueron 5 los puntos que no se ajustaron en la relación I/E de bacterias a la norma (un despacho y el pasillo del sótano, el pasillo de la planta primera y de nuevo, el pasillo y baño de la segunda planta), mientras que para hongos se incumplió en tres de los puntos muestreados (un pasillo del sótano y el baño y pasillo de la primera planta).

En otoño, tanto para hongos como para bacterias, únicamente los niveles de bacterias del pasillo de la primera planta no cumplieron la norma.

En el edificio moderno todos los puntos exceptuando la sala blanca, incumplieron los niveles establecidos por la norma para bacterias en invierno. En primavera y verano, se superaron los niveles en tres puntos (baño y almacén del sótano y pasillo de la primera planta en primavera y almacén del sótano, despacho de la planta baja y pasillo de la primera planta en verano) mientras que en otoño, solo se incumplió la norma en el pasillo de la primera planta. En el caso de hongos, únicamente se sobrepasaron los valores establecidos por la norma, en el pasillo de la primera planta en primavera y verano.

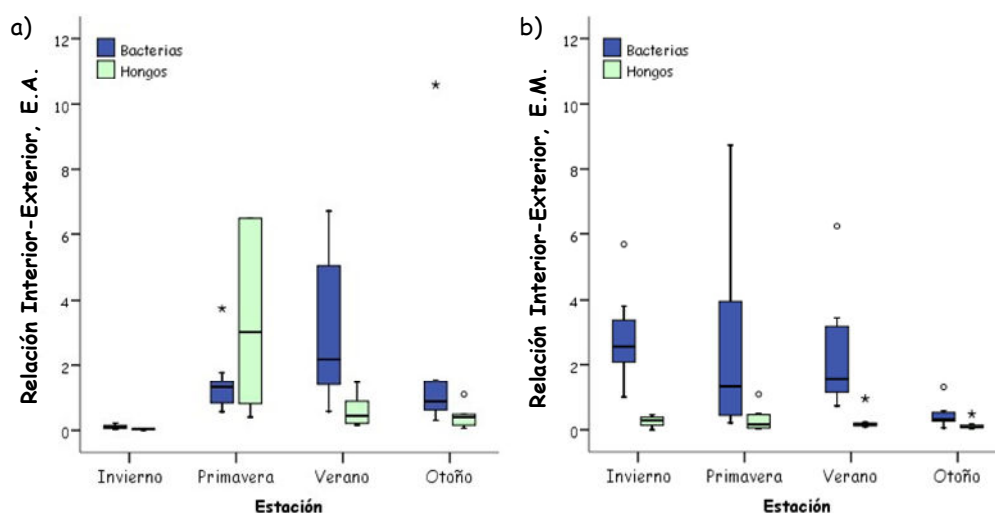


Figura 4.25. Relación Interior/Exterior de los valores de UFC/m³ de bacterias y hongos de los edificios a) edificio antiguo y b) edificio moderno en cada estación.

La distribución de los valores correspondientes a la relación I/E, mostró poca dispersión en invierno para las muestras de hongos y bacterias del edificio antiguo, siendo el valor de la mediana muy próximo para ambos tipos de muestras. En primavera, la distribución mostró asimetría positiva para bacterias, contando con un caso extremo, sin embargo, la dispersión de los datos y el valor de la mediana fue mayor en el caso de hongos. Por el contrario, en verano, tanto la dispersión como el valor de la mediana, fueron

superiores en el caso de bacterias, presentando la distribución asimetría positiva. En otoño, estas diferencias fueron menos marcadas, presentando ambas distribuciones asimetría positiva, con un caso extremo en la distribución de bacterias y un caso atípico en la de hongos (figura 4.25a). En la relación I/E de las UFC/m³ de bacterias, las diferencias entre estaciones fueron significativas para todas las estaciones exceptuando entre la primavera y el otoño (el invierno presentó con la primavera Sig.=0.000, con el verano, Sig.=0.002 y con el otoño, Sig.=0.000; la primavera, presentó con el verano Sig.=0.049 y el verano con el otoño, Sig.=0.028). En la relación I/E de las UFC/m³ de hongos, todas las estaciones presentaron diferencias significativas entre sí, exceptuando la de verano con el otoño (el invierno presentó con la primavera Sig.=0.000, con el verano, Sig.=0.003 y con el otoño, Sig.=0.004; la primavera, presentó con el verano Sig.=0.006 y la primavera con el otoño, Sig.=0.001).

La relación de UFC/m³ I/E de bacterias, siguió para el edificio moderno una distribución normal en las estaciones de invierno (Sig.= 0.364)) y verano (Sig.= 0.053). En el caso de hongos la distribución fue normal únicamente en invierno (Sig.= 0.294). Las medianas de los datos de la relación de UFC/m³ I/E fueron superiores en el caso de muestras bacterianas que de hongos, en todas las estaciones del edificio moderno, además los valores de las medianas fueron muy similares en el caso de hongos durante todo el año. Las distribuciones de las UFC/m³ tuvieron asimetría positiva y fueron considerablemente más dispersas que las distribuciones de hongos. Tanto en invierno como en verano apareció un caso atípico en las distribuciones de bacterias mientras que las distribuciones de la relación I/E de hongos presentaron un caso atípico en primavera y un caso extremo en verano y otoño. Las diferencias entre estaciones fueron significativas para bacterias entre invierno y otoño (Sig.= 0.001) y entre verano y otoño (Sig.=0.002). En el caso de hongos, solamente fueron significativas las diferencias entre verano y otoño (Sig.=0.035) (figura 4.25 b).

4.3.5. Correlación de las UFC/m³ de hongos con la temperatura y humedad relativa.

En ninguno de los dos edificios se encontró correlación alguna entre los datos de UFC/m³ de hongos con los valores de temperatura y humedad relativa tomadas en los mismos puntos.

4.3.6. Identificación de hongos.

Mediante microscopía óptica, se llevó a cabo una identificación de las colonias fúngicas aisladas en los distintos puntos muestreados hasta el nivel de clase o género (figura 4.26).

En invierno, predominaron las levaduras tanto en el interior como en el exterior del edificio antiguo, seguidas de *Penicillium* en el interior y de otros hifomicetos (no identificados). En el exterior se detectaron levaduras, hifomicetos, *Penicillium* y *Alternaria*.

En primavera, destacó *Cladosporium* en el interior, seguido de *Alternaria* y *Penicillium*, mientras que en el exterior, los niveles de *Alternaria* fueron ligeramente mayores que los de *Cladosporium*, seguidos de las levaduras, *Aureobasidium* y *Penicillium*.

En verano, se detectaron un gran número de hongos filamentosos que no esporulaban, tanto en el interior como en el exterior. Las levaduras y *Penicillium*, predominaron también

en el interior y en el exterior, aunque en las muestras externas los mayores niveles los presentó *Alternaria*.

En otoño, *Penicillium* predominó tanto en el interior como en el exterior, seguido de levaduras y otros hifomicetos en el interior y de *Alternaria* y otros hifomicetos en el exterior.

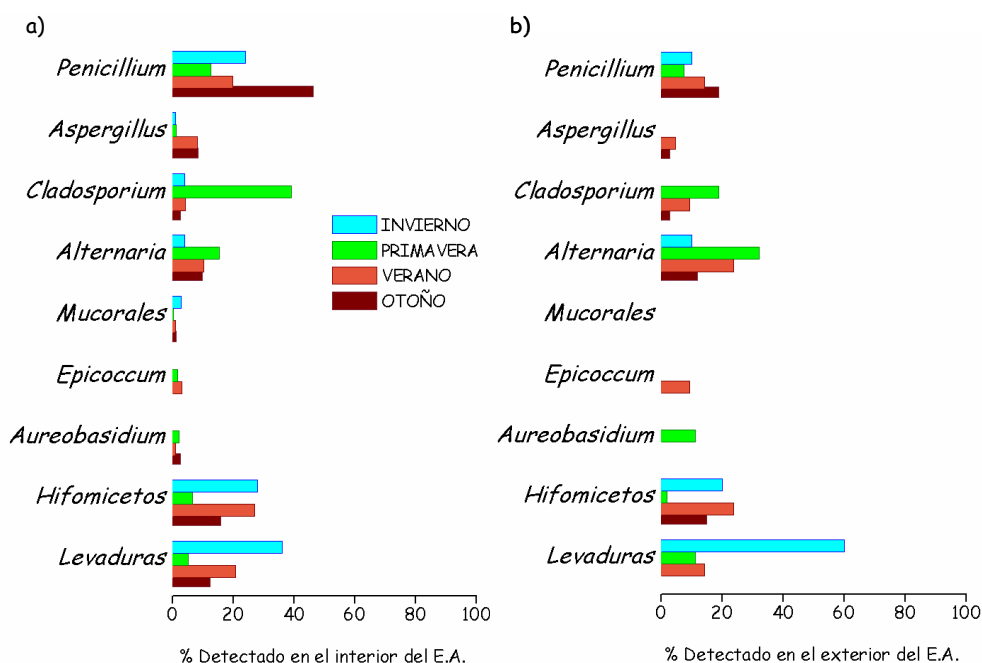


Figura 4.26. Identificación de géneros y clases de hongos detectados en el interior y exterior del edificio antiguo.

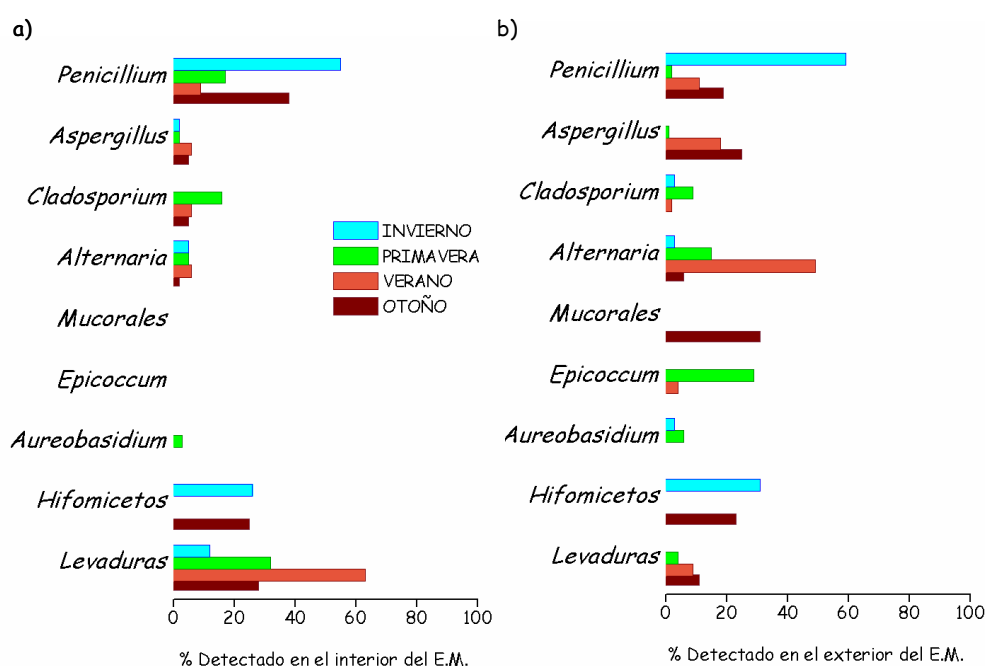


Figura 4.27. Identificación de géneros de hongos en el interior y exterior del edificio moderno.

En el edificio moderno, en invierno, *Penicillium* se detectó en más del 50% de las muestras tomadas tanto en el exterior como en el interior, seguido de otros hifomicetos (figura 4.27).

En primavera fueron más abundantes las levaduras, *Penicillium* y *Cladosporium*, en las muestras interiores, mientras que en las exteriores, *Epicoecum* fue mayoritario seguido de *Alternaria* y *Cladosporium*. En verano, las levaduras predominaron en las muestras interiores tomadas en este edificio, seguidas de *Penicillium*, destacando en el exterior *Alternaria*, seguida de *Aspergillus* y *Penicillium*. En otoño, prevaleció *Penicillium* en el interior, seguido de las levaduras y otros hifomicetos mientras que en el exterior, resultaron mayoritarios, los Mucorales, *Aspergillus* y *Penicillium*.

4.4. ACTIVIDAD FOTOCATALÍTICA Y FOTOLÍTICA DE UN REACTOR TUBULAR A ESCALA DE LABORATORIO.

Una vez seleccionada una metodología para la toma y análisis de muestras, y de observar la variaciones que tenían lugar en las cantidades de hongos y bacterias suspendidos en el aire en función de la estación del año o el tipo de edificio, se llevaron a cabo una serie de ensayos con el fin de aplicar la fotocatalisis, como método de tratamiento de hongos y bacterias de aire interior. Para ello, se desarrolló un sistema fotocatalítico/fotolítico a nivel de laboratorio y se valoró su capacidad de alterar las UFC/m³ en muestras de aire tratadas con respecto a muestras control. El fotorreactor empleado en los experimentos y la metodología de ensayo, se describen en el apartado 3.6.1 (Sánchez y col., 2012).

Se valoró la actividad fotolítica del reactor cuando se activaron en su interior lámparas comerciales de luz UV-A y UV-C, de dos intensidades diferentes, así como la actividad fotocatalítica del mismo con dichas lámparas, cuando además se introducía en él dióxido de titanio soportado sobre monolitos como catalizador.

La temperatura y la humedad oscilaron entre 22-26°C y 20-40% respectivamente durante todos los experimentos.

4.4.1. Actividad bactericida.

Los resultados de los blancos, y de las pruebas fotolíticas y fotocatalíticas realizadas, se muestran en la tabla 4.12. La concentración de bacterias en las muestras control (sin tratamiento) varió de 50 a 200 UFC/m³ durante todos los ensayos realizados. Los valores mostrados, son la media de 6 repeticiones para cada análisis. La incorporación del fotorreactor con la lámpara apagada, no modificó la concentración de bacterias, sin embargo, cuando se introdujeron los monolitos de PET, con o sin TiO₂, en el interior del reactor (experimentos blanco), si que se observó una ligera reducción de la concentración por debajo del 10%, atribuida a la adsorción de éstas a las paredes de los monolitos.

La irradiación con UV-A y UV-C redujo visiblemente la concentración bacteriana. Como se esperaba, el efecto de la irradiación con UV-A fue menor que con UV-C, con la que se consiguió reducir la presencia de bacterias con una eficiencia del 70% y 80% con lámparas de potencia 8W y 16W respectivamente.

Al añadir el fotocatalizador al reactor, el efecto bactericida de las lámparas de UV-A aumentó hasta alcanzar unas eficiencias similares a las de las lámparas de UV-C. No ocurriendo lo mismo en el caso de las lámparas de UV-C, con las que el catalizador no mejoró la eficiencia de las mismas.

Mediante la prueba T de Student (apartado 3.7) se determinó que las medias en UFC/m³ de muestras sometidas a los tratamientos fotocatalíticos con luz UV-A de 8W (Sig.=0.00) y de 15W (Sig.= 0.02), y con luz UV-C de 8W (Sig.=0.00) y de 16W (Sig.=0.00) eran significativamente diferentes de las UFC/m³ medias de muestras control tomadas simultáneamente. Sin embargo, el resto de tratamientos fotolíticos, con luz de UV-A de 8W (Sig.=0.45), de 15W (Sig.=0.09) y de UV-C de 8W (Sig.=0.05) no lo fueron.

Un aumento de vatios en las lámparas de UV-A, no generó una eficiencia significativamente mayor en ninguno de los dos tratamientos (fotocatálisis, Sig.=0.82; fotolisis, Sig. =0.20). Al añadir el catalizador al reactor, la eficiencia obtenida con la lámpara de UV-A de 8W fue comparable a la obtenida por fotocátalisis con las lámparas de 15W y de UV-C de 8W (Sig.=0.5) y 16W (Sig.=0.14). También fue comparable a la eficiencia obtenida con fotolisis y lámpara de UV-C de 8W (Sig.=0.8).

Experimento		Lámpara	PET	TiO ₂	Eficiencia del tratamiento (%)
Sin irradiación	Blanco lámpara	apagada	no	no	0
	Blanco PET	apagada	si	no	7
	Blanco TiO ₂	apagada	si	si	8
UV-A	Fotolisis UVA-8W	encendida	no	no	30
	Fotocatálisis UVA-8W	encendida	si	si	69
	Fotolisis UVA-15W	encendida	no	no	48
	Fotocatálisis UVA-15W	encendida	si	si	68
UV-C	Fotolisis UVC-8W	encendida	no	no	70
	Fotocatálisis UVC-8W	encendida	si	si	64
	Fotolisis UVC-16W	encendida	no	no	80
	Fotocatálisis UVC-16W	encendida	si	si	76

Tabla 4.12. Características del primer grupo de experimentos y resultados obtenidos para bacterias.

El añadir el catalizador al reactor con lámparas de UV-C no aumentó significativamente la eficiencia del mismo con respecto al tratamiento fotolítico (con 8W, Sig.=0.46; con 16W, Sig.=0.40). Sin embargo, un aumento de vatios de las lámparas de UV-C, produjo un aumento de eficiencia significativo cuando no se añadió el catalizador (Sig.=0.016). Con catalizador no hubo mejora significativa en la eficiencia entre fotocátalisis con luz UV-C de 8W y luz UV-C de 16W (Sig.=0.15).

Con el fin de aumentar el tiempo de residencia de los contaminantes en el interior del reactor, se repitieron los experimentos con muestreadores de aire que trabajaban a menor caudal, como los muestreadores SPIN AIR V2 (100L/min) y que conforme a resultados experimentales obtenidos en el laboratorio, eran más precisos en sus medidas (ver apartado 4.3) (Sánchez-Muñoz y col., 2012). Los resultados mostraron un aumento de actividad fotolítica y fotocatalítica, al utilizar este tipo de muestreador y la variación

entre repeticiones también fue menor. Los datos obtenidos con lámparas de 8W de UV-A y UV-C se muestran en la figura 4.28.

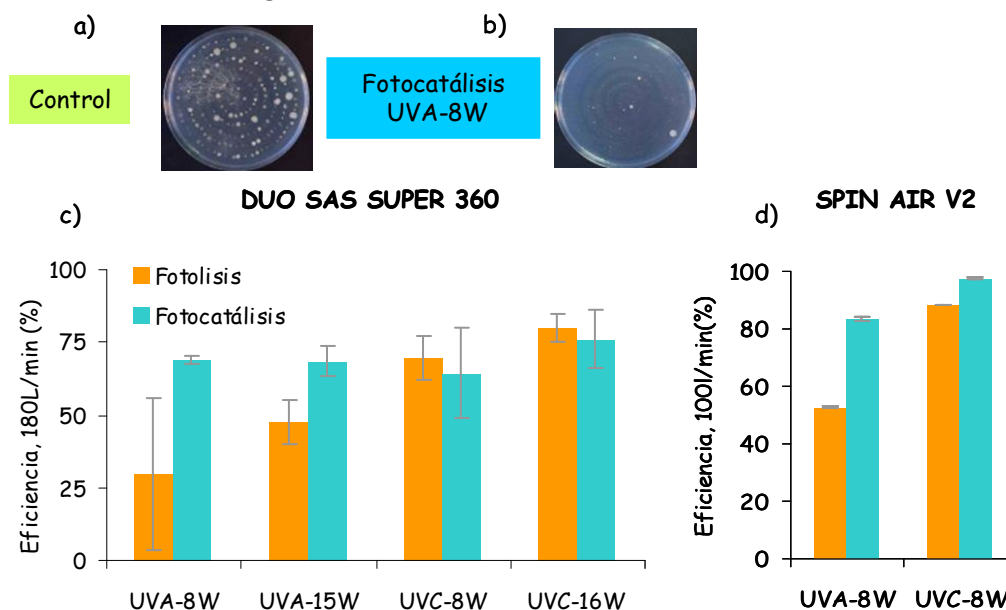


Figura 4.28. a) Imagen de una muestra control y b) muestra tomada con el reactor con catalizador y lámpara de UV-A de 8W. c) y d) Datos de eficiencia en desinfección de bacterias con lámparas de UV-A y UV-C, de dos intensidades diferentes, con y sin catalizador. En el gráfico de la izquierda (c), se aspiró el aire con un caudal de 180L/min a través del reactor (muestreador DUO SAS SUPER 360), y en el de la derecha (d) a 100L/min (muestreador SPIN AIR V2).

4.4.2. Actividad fungicida.

El tratamiento fotolítico con lámparas de UV-A y UV-C y el tratamiento fotocatalítico, añadiendo el fotocatalizador al reactor, no consiguió disminuir la cantidad de hongos a su paso por el reactor (figura 4.29).

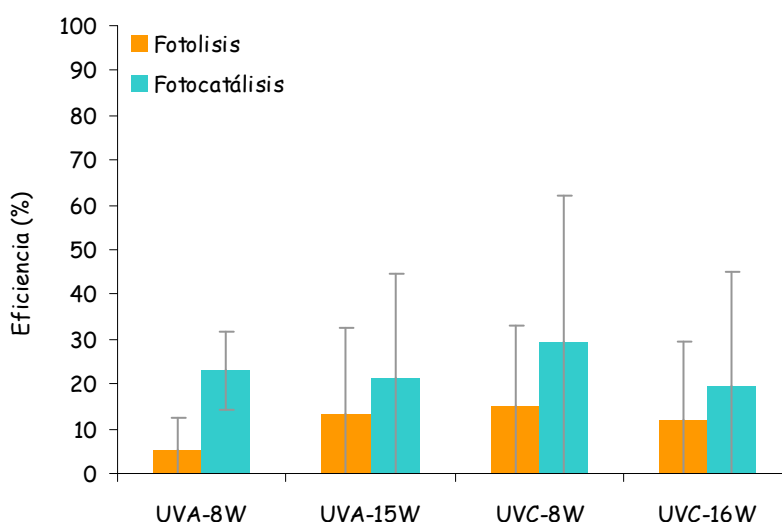


Figura 4.29. Datos de eficiencia del reactor para la reducción de las UFC/m³ de hongos, mediante el empleo de lámparas de UV-A y UV-C, de dos intensidades diferentes, con y sin catalizador.

La disminución de la velocidad del aire a su paso por el reactor mediante el cambio a los muestreadores SPIN AIR V2 (100L/min) o al impactador BioStage (14.15L/min), no mejoró

los resultados. El empleo de un reactor más largo, de 72cm, consistente en tres unidades idénticas del mismo reactor colocadas secuencialmente, aumentó el tiempo de residencia de las esporas fúngicas en el interior del mismo, pero tampoco consiguió afectar visiblemente a su supervivencia.

Se llevó a cabo una identificación de las cepas que sobrevivían a su paso por el reactor, de la manera especificada en el apartado 3.4.2 de la metodología. Se detectaron especies comunes en aire interior de los géneros *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Penicillium* y *Mucor*, así como levaduras.

4.4.3. Análisis SEM- EDX.

Se realizó un análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM) de fragmentos de monolitos del reactor que habían sido utilizados en los experimentos blanco con TiO_2 y de monolitos, que se emplearon en los ensayos fotocatalíticos con lámparas de 8W de UV-A (apartado 3.6.1). Las imágenes mostraron la presencia de bacterias adheridas a la superficie del monolito antes y después del tratamiento. El monolito tratado presentó también restos de materia orgánica en su superficie (figura 4.30).

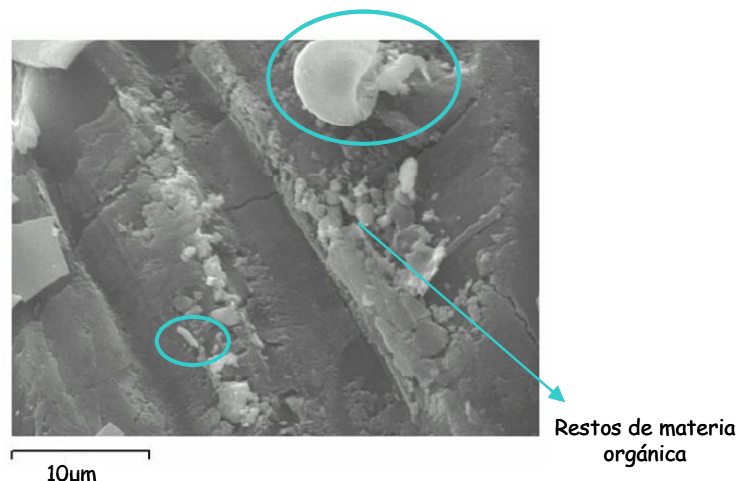


Figura 4.30. Imagen de SEM de un fragmento de PET con TiO_2 depositado después del tratamiento fotocatalítico con luz UV-A (8W). En la imagen puede observarse la presencia de una bacteria (círculo pequeño) y un posible resto fúngico (círculo grande) adheridos a la superficie del monolito impregnado con TiO_2 .

4.4.4. Análisis a largo plazo de la eficiencia del sistema fotocatalítico

Se llevaron a cabo repeticiones regulares de los experimentos fotocatalíticos y fotocatalíticos de desinfección en las mismas condiciones experimentales a lo largo de un año, en el que se repitieron los resultados de eficiencia obtenidos inicialmente (figura 4.31).

Con el objetivo de conocer que especies bacterianas eran resistentes al tratamiento fotocatalítico en nuestras condiciones experimentales, se llevó a cabo una identificación periódica de las especies que eran capaces de reproducirse después de su paso por el reactor. Para ello, se llevó a cabo una PCR de las colonias, amplificándose el gen 16S ARNr completo de la manera descrita en el apartado 3.4.8. Las secuencias se obtuvieron y analizaron tal y como se describe en el apartado 3.4.15.

Se identificaron del mismo modo muestras control, con el fin de realizar una caracterización del ambiente interior en el que se estaba trabajando. Las especies que mostraron homología con las bacterias aisladas en dicho experimento, tras la comparación de las secuencias con las bases de datos del GenBank, y que resistían al tratamiento, así como su frecuencia de aparición, se muestran en la tabla 4.13.

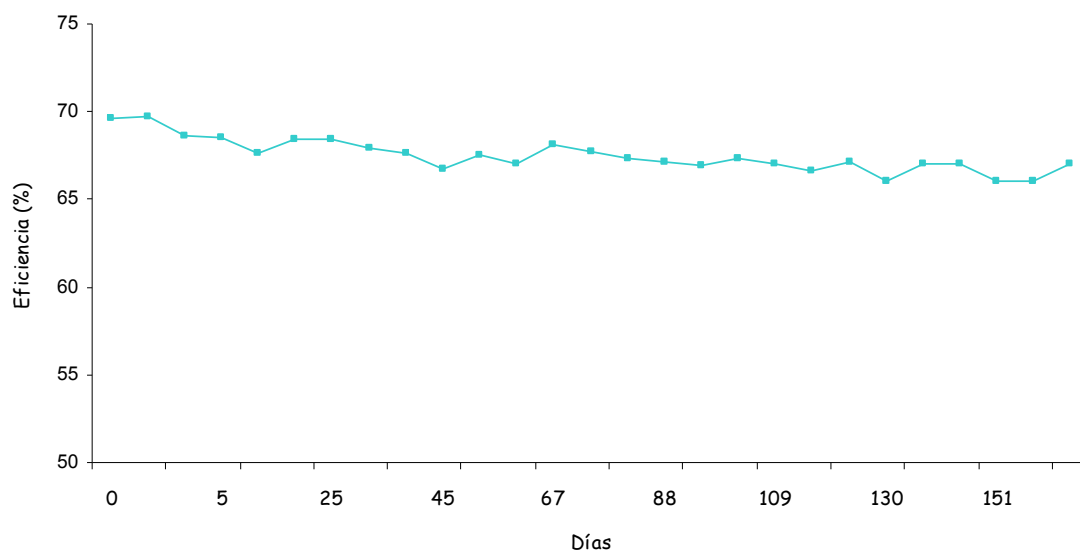


Figura 4.31 Eficiencia en la disminución de UFC/m³ de bacterias, del reactor, mediante fotocátalisis con luz UV-A. Se muestran los datos recogidos durante los 5 primeros meses.

BLAST	%Similitud resistentes fotocatálisis/8W-A	Frecuencia de aislamiento de bacterias resistentes fotocatálisis/8W-A	%Similitud Control
<i>Arthrobacter boritolerans</i>	98	1	100
<i>Arthrobacter protophormiae</i>	100	9	100
<i>Bacillus flexus</i>			99
<i>Bacillus firmus</i>			100
<i>Bacillus niacini</i>			100
<i>Bacillus thuringiensis</i>	100	7	
<i>Bacteroidetes endosymbiont</i>	100	1	
<i>Burkholderia sp</i>	98	4	
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	98	3	
<i>Escherichia coli</i>	100	21	100
<i>Enterobacter aerogenes</i>	100	12	98
<i>Enterobacter amnigenus</i>	100	4	
<i>Enterobacter sakazakii</i>	100	7	100
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100	12	98
<i>Micrococcus luteus</i>	99	8	100
<i>Nocardia aureus</i>	100	2	
<i>Pantotea sp.</i>	100	2	
<i>Pasteurella haemolytica</i>	98	8	
<i>Proteus mirabilis</i>	100	3	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			99
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	100	12	
<i>Pseudomonas luteola</i>			100
<i>Pseudomonas putida</i>	100	21	
<i>Serratia marcescens</i>	100	21	100
<i>Staphylococcus aureus</i>	99	5	
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>			100
<i>Staphylococcus hominis</i>			100
<i>Staphylococcus lentus</i>	98	5	
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	99	3	99
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99	6	99
<i>Staphylococcus succinus</i>	100	2	
<i>Staphylococcus vitulinus</i>	99	7	
<i>Staphylococcus xylosus</i>	100	21	100
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99	21	100

Tabla 4.13. Resultados de la comparación, mediante el programa BLAST con las bases de datos del Genbank, de las secuencias obtenidas de bacterias resistentes al tratamiento fotocatalítico con lámpara de 8W de UV-A. También se muestran los resultados de identificación de muestras control, así como la frecuencia de aislamiento.

Posteriormente, se llevó a cabo una nueva identificación de las especies que estaban resistiendo al tratamiento fotocatalítico con lámparas de 8W de UV-A para su comparación con las especies identificadas que resistían al tratamiento fotocatalítico más agresivo, con lámparas de 16W de UV-C. Al mismo tiempo, se realizó una caracterización del aire ambiente, muestras control, con el objetivo de encontrar diferencias a nivel de especies. Los resultados se muestran en la tabla 4.14.

BLAST	%Similitud resistentes fotocatálisis/8WA	%Similitud resistentes fotocatálisis/16WC	% Similitud control
<i>Acinetobacter lwoffii</i>			100
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	100		
<i>Acinetobacter sp</i>		96	
<i>Arthrobacter luteolus</i>		99	
<i>Bacillus endophyticus</i>	100		
<i>Bacillus megaterium</i>			100
<i>Bacillus simplex</i>			100
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>		100	
<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>			97
<i>Dermacoccus sp</i>			95
<i>Enterobacter asburiae</i>			100
<i>Kocuria rosea</i>	99		100
<i>Leucobacter alluvii</i>			99
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>			100
<i>Macrococcus equipercicus</i>		100	
<i>Micrococcus luteus</i>	99	100	100
<i>Naxibacter haematophilus</i>	99		
<i>Pantoea agglomerans</i>			99
<i>Psychrobacter faecalis</i>			100
<i>Staphylococcus condimenti</i>			100
<i>Staphylococcus hominis</i>		100	
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	100		100
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	100		99
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		100	

Tabla 4.14 Resultados de la comparación, mediante el programa BLAST, con las bases de datos del Genbank, de las secuencias de bacterias procedentes de muestras control o de tratamientos fotocatalíticos con luz de UV-A de 8W/UV-C de 16W.

4.5. ACTIVIDAD FOTOCATALÍTICA Y FOTOLÍTICA DE UN REACTOR A ESCALA DE DEMOSTRACIÓN

A la luz de los primeros resultados obtenidos a escala de laboratorio con un reactor tubular se decidió diseñar y construir un fotorreactor a escala de demostración, que permitiera modificar el caudal del aire a su paso por el mismo, así como, el uso de un mayor número de lámparas y cantidad de catalizador. El prototipo se erigió en una oficina y sus características, así como la metodología de los ensayos que se llevaron a cabo con él, se describen en el apartado 3.6.2. En el anexo I se muestran los planos del reactor.

Se analizaron las variaciones en la cantidad de hongos y bacterias en suspensión mediante tratamientos fotolíticos y fotocatalíticos del aire interior del despacho. Para ello, se efectuaron una serie de ensayos preliminares en los que se estudió principalmente el tiempo y cantidad de irradiación, variando el número de lámparas o el número de horas que éstas se mantenían encendidas. Por otro lado, también se utilizaron dos tipos diferentes de luz UV (UV-A y UV-C).

4.5.1. Efecto del tiempo de irradiación con luz germicida UV-C (fotólisis).

En primer lugar se llevaron a cabo una serie de ensayos en ausencia de catalizador con 3 lámparas de luz germicida UV-C, en los que se varió el tiempo de irradiación. En la figura 4.32 se representa la eficiencia obtenida tras los diferentes tratamientos en función del tiempo transcurrido desde el apagado de las lámparas. Las barras de error muestran la desviación estándar.

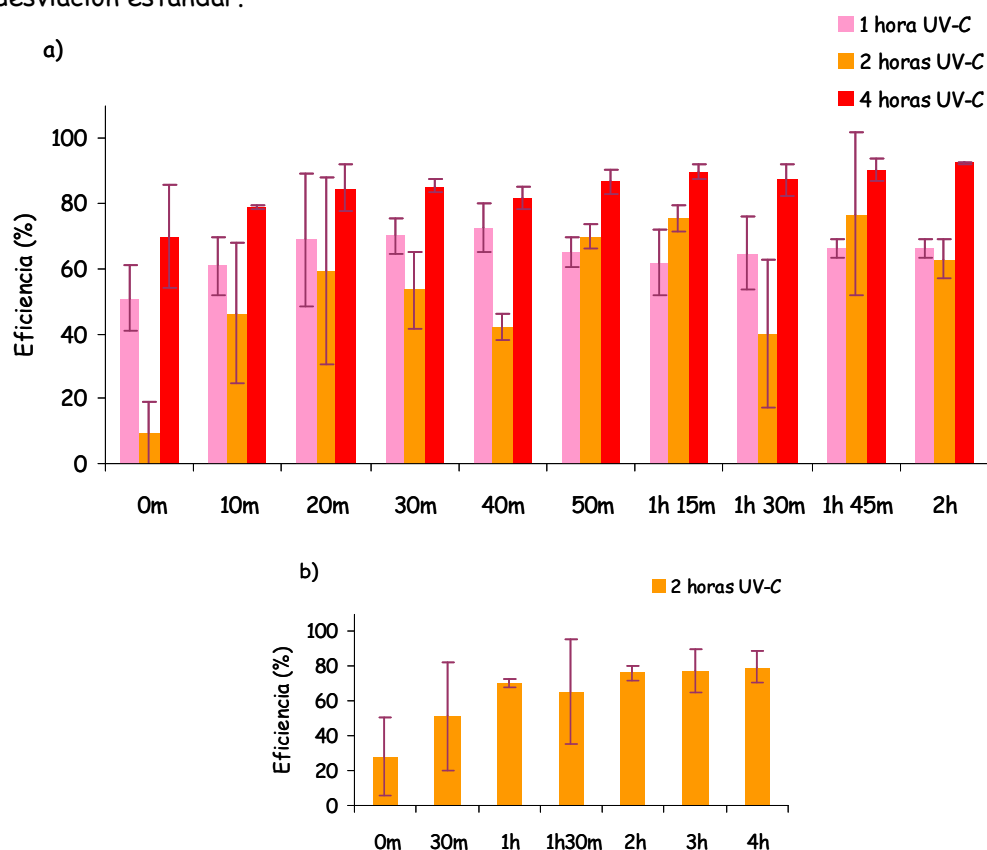


Figura. 4.32. a) Eficiencia obtenida para la desinfección de bacterias tras el tratamiento del aire del despacho estudiado con 3 lámparas de UVC, sin catalizador, durante 1,2 y 4 horas; b) Repetición del tratamiento de 2h.

El tratamiento con tres lámparas durante cuatro horas alcanzó eficiencias en la eliminación de bacterias de hasta el 93%, manteniéndose siempre por encima del 70%. El número de UFC/m³ tras dicho tratamiento fue siempre inferior al número obtenido en tratamientos más cortos. Con una hora con las lámparas encendidas, las eficiencias oscilaron del 51 al 73% mientras que con dos horas, se obtuvieron en la mayor parte de las medidas eficiencias menores que con el tratamiento de 1 hora (figura 4.32a). El ensayo de dos horas se repitió con tomas de muestras más espaciadas y durante 4h tras el tratamiento, mejorando de esta forma ligeramente las eficiencias, que llegaron hasta un 80% (figura 4.32b). Tras los tratamientos de 2 y 4 horas, se mantuvo la puerta del despacho cerrada hasta el día siguiente, momento en el que se abrió para efectuar una nueva toma de muestra. Las UFC/m³ de bacterias, habían recuperado prácticamente los niveles iniciales previos al inicio del ensayo.

En los tratamientos de larga duración, se observó una menor oscilación en el número de unidades formadoras de colonias captadas, siendo los valores más repetitivos.

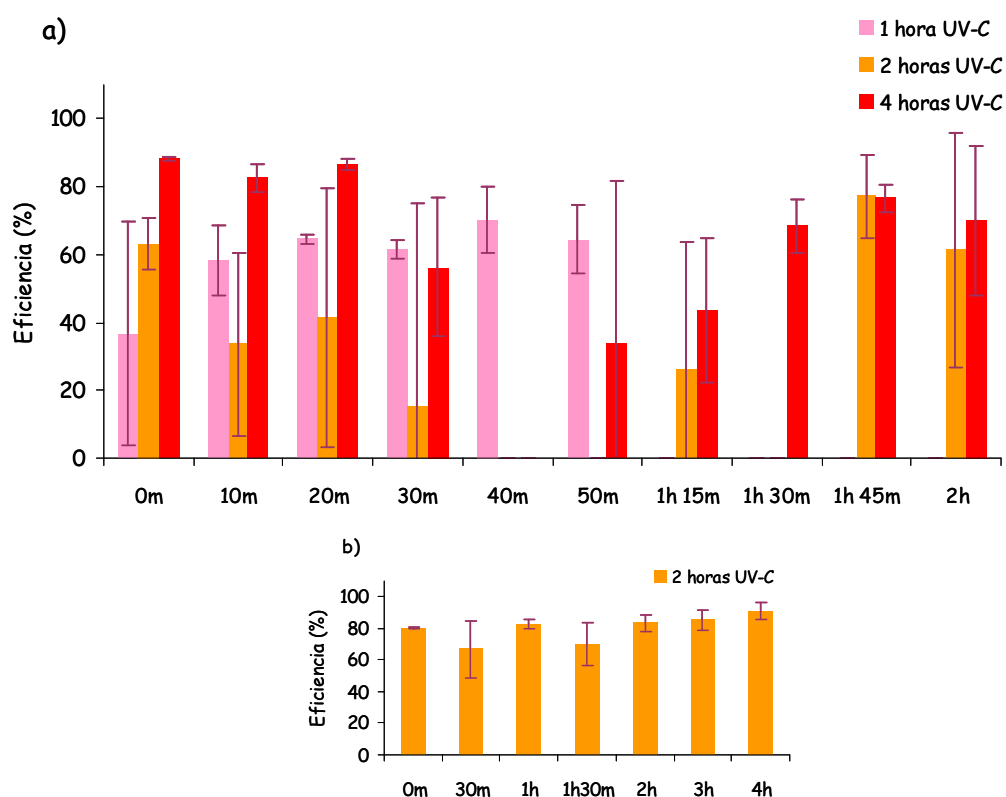


Figura 4.33. a) Eficiencia obtenida para la desinfección de hongos tras el tratamiento con 3 lámparas de UVC, sin catalizador, durante 1,2 y 4 horas en el despacho estudiado; b) Repetición del tratamiento de 2h.

El tratamiento con luz UV-C del aire circulante del despacho fue en general menos eficiente en la eliminación de células o esporas fúngicas. El encendido de las lámparas durante una hora, consiguió disminuir la supervivencia de hongos de un 37 a un 70%. Sin embargo, el efecto se mantuvo únicamente durante 50 minutos puesto que en la siguiente muestra tomada los niveles de UFC/m³ iniciales se habían recuperado.

En el tratamiento de dos horas, los niveles de hongos recuperaron las cantidades iniciales a los 40, 50 minutos y a la hora y 30 minutos. A pesar de ello, se llegó a obtener un máximo del 77% de eficiencia a la hora y 45 minutos desde el apagado de las lámparas. Después de cuatro horas de iluminación, con luz UV-C, del aire del despacho a su paso por el reactor, los niveles de hongos, recobraron los valores iniciales a los 40 minutos, sin embargo, su supervivencia volvió a decaer, llegándose a alcanzar eficiencias de hasta un 76% a la hora y 45 minutos (como había ocurrido en el tratamiento de dos horas). El máximo que se obtuvo fue del 88% de eficiencia en la muestra tomada inmediatamente al apagado de las lámparas (figura 4.33a). En la repetición del tratamiento durante dos horas los valores de eficiencia mostraron valores más constantes en las muestras post-tratamiento, con un mínimo del 66% y un máximo del 90% a las 4 horas del término del tratamiento, superándose incluso, la eficiencia que se había obtenido en el mismo experimento para la disminución de las UFC/m³ de bacterias (figura 4.33b).

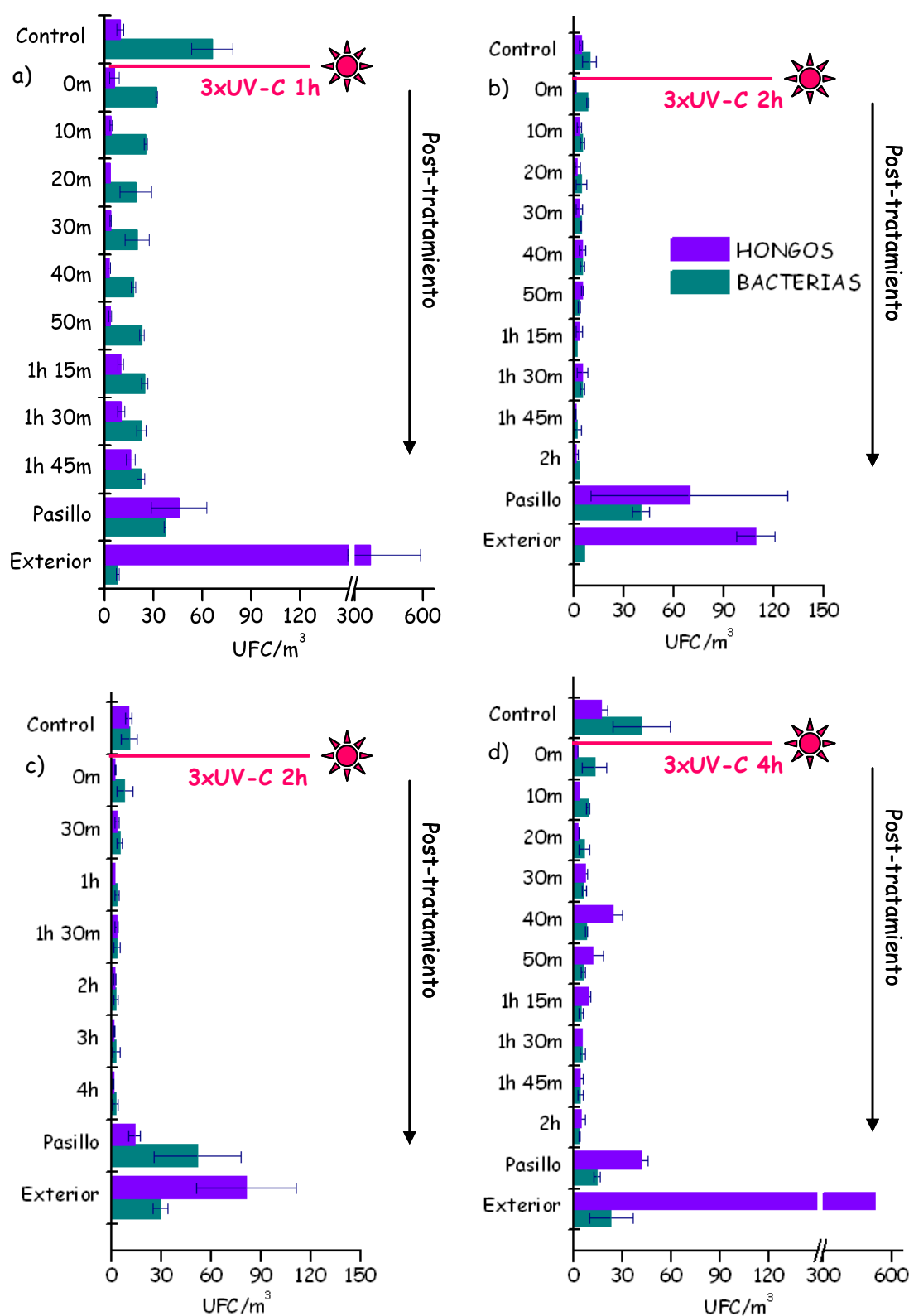


Figura 4.34. Evolución de las UFC/m³ de hongos y bacterias durante los ensayos realizados en el despacho tras el tratamiento con luz UV-C. Se muestran también los niveles de colonias en el pasillo exterior al despacho y en el exterior del edificio, para los tratamientos con 3 lámparas de UV-C durante, a) 1 hora, b) 2 horas, c) 2 horas (repetición), d) 4 horas.

En la figura 4.34 se muestran las oscilaciones en el número de UFC/m³ de hongos y bacterias, una vez apagadas las lámparas en los tratamientos del aire con lámparas de UV-C durante 1 (a), 2 (b y c) y 4 horas (d). Puede constatar un descenso en el número de colonias en prácticamente todas las muestras post-tratamiento. Se indican a su vez, los valores medios de las muestras control (se tomaron en el despacho antes de que comenzara cada tratamiento) así como, los niveles de hongos y bacterias de muestras tomadas en el pasillo colindante al despacho y en el exterior del edificio una vez tomadas las muestras tras el tratamiento, en el interior del despacho (las muestras exteriores al despacho se tomaron tal y como se describe en el apartado 3.6.2. de la metodología). Se comprobó que los valores de UFC/m³ de hongos y bacterias de las muestras tomadas en el pasillo, fueron siempre iguales o superiores a las del despacho ensayado. Por otro lado, los valores de UFC/m³ exteriores de hongos siempre fueron superiores a los interiores, mientras que los niveles de bacterias en el exterior fueron tan solo superiores a los interiores del despacho cuando se realizó el segundo tratamiento de 2 horas (figura 4.34c).

4.5.2. Efecto de la cantidad de irradiación germicida UV-C (fotólisis).

Posteriormente se llevó a cabo un experimento en el que se aumentó la irradiancia con respecto a los tratamientos anteriores, mediante el encendido de un mayor número de lámparas en el interior del reactor. Se siguió el mismo procedimiento que en los ensayos previos, activando esta vez 9 lámparas de luz UV-C en el interior del reactor, durante una hora.

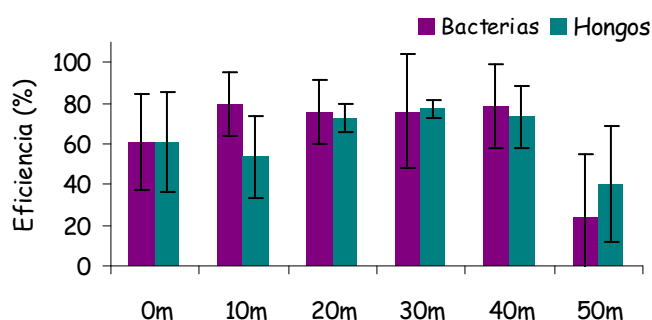


Figura 4.35. Eficiencia obtenida para la desinfección de hongos y bacterias tras el tratamiento con 9 lámparas de UVC, sin catalizador, durante 1 hora en el despacho estudiado.

En la figura 4.35, se muestran los valores de eficiencia del tratamiento para la disminución de los números de UFC/m³ de hongos y bacterias durante 1 hora transcurrido el tratamiento. La eficiencia se mantuvo entre un 61 y un 80% para los niveles de bacterias, y entre un 54 y un 77% para los niveles de hongos durante los primeros 40 minutos tras el tratamiento. Sin embargo, transcurrido ese tiempo, las eficiencias descendieron a un 24% y a un 40% en los niveles de bacterias y hongos respectivamente.

4.5.3. Tratamiento fotocatalítico de hongos y bacterias de aire interior.

Con el fin de comparar la eficiencia de los tratamientos fotocatalíticos del aire del despacho con tratamientos fotocatalíticos realizados con las mismas lámparas y en las mismas condiciones, se llevaron a cabo una serie de ensayos en los que se activaron 3

lámparas de luz UV-A o UV-C, durante 4 horas. Además, para los ensayos fotocatalíticos se introdujeron monolitos con dióxido de titanio soportado en el interior del reactor.

Los tratamientos del aire interior mediante fotólisis con luz UV-A mostraron eficiencias de hasta un 66% para la disminución de la cantidad de bacterias en suspensión (figura 4.36)

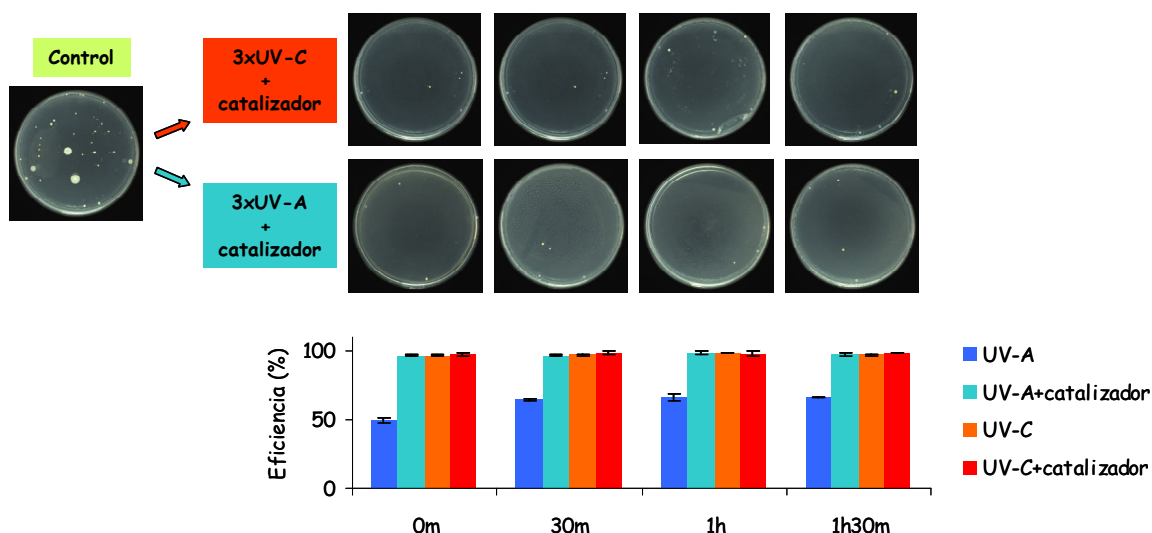


Figura 4.36. Eficiencia obtenida para la destrucción de bacterias tras el tratamiento con 3 lámparas de UVA o C, con o sin catalizador, durante 4 horas en el despacho estudiado.

La pérdida de viabilidad bacteriana osciló entre el 97 y 99%, al tratar el aire del despacho durante cuatro horas con luz germicida o mediante fotocátalisis con UV-A/UV-C. La desinfección del aire se mantuvo constante durante la hora y 30 minutos en los que se tomaron muestras, transcurridos los tratamientos.

Con respecto al efecto de los tratamientos anteriores sobre la viabilidad de los hongos del aire del despacho se comprobó que para llegar a obtener eficiencias de al menos un 80% con tratamientos fotocatalíticos con luz UV-A, fue necesario activar 9 lámparas durante 4 horas (figura 4.37). Los valores de UFC/m³ de hongos se mantuvieron relativamente constantes durante 1h y 30 min transcurrido el tratamiento.

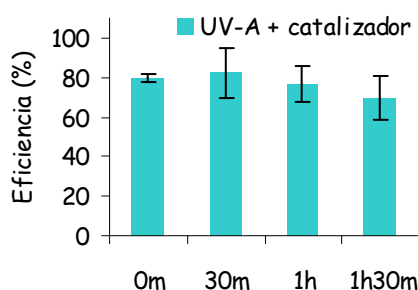


Figura 4.37. Eficiencia obtenida para la destrucción de hongos tras el tratamiento con 9 lámparas de UVA con catalizador durante 4 horas en el despacho estudiado.

5. DISCUSIÓN

5.1. CARACTERIZACIÓN DE HONGOS Y BACTERIAS DE AIRE INTERIOR MEDIANTE EL USO DE DIFERENTES METODOLOGÍAS

En el presente estudio se ha abordado un problema de salud ambiental como es la calidad del aire interior desde un punto de vista microbiológico, centrándose en la caracterización de los hongos y bacterias detectables en aire de diferentes ambientes laborales. A pesar de que la presencia de dichos microorganismos es ubicua, es precisamente cuando se encuentran en suspensión en el aire, cuando pueden ser inhalados, entrando en contacto directo con las vías respiratorias. Se sabe que una exposición prolongada a altas concentraciones de bioaerosoles puede provocar daños en la salud, que en ocasiones pueden ser graves, como las enfermedades por hipersensibilidad (Patel y col., 2001), las reacciones de toxicidad o las infecciones. En los países desarrollados, el ser humano pasa la mayor parte de su tiempo diario en diferentes ambientes interiores entre los que se encuentra su lugar de trabajo. Una alta ocupación en estos espacios interiores, una falta de ventilación y limpieza, o una elevada humedad pueden provocar un aumento de hongos y bacterias en suspensión, a los que un trabajador está expuesto durante alrededor de 8 horas al día. Se sabe que algunas de las enfermedades que se desarrollan en entornos de trabajo, están directamente relacionadas con la exposición prolongada a una mala calidad del aire. De hecho, la norma UNE 171330-1 recomienda una monitorización periódica de la calidad de aire en dichos ambientes. Se advierte que una concentración alta de bioaerosoles puede provocar una disminución de la eficiencia en el trabajo al producir molestias o enfermedades en las personas expuestas a ellos (UNE 171330-1, 2008).

La propuesta principal de este trabajo ha sido el diseño y construcción de un sistema que permitiera tratar los contaminantes presentes en el aire de un ambiente real de trabajo, mediante fotocátalisis heterogénea. El aire tratado, fue siempre aire interior real, por lo que para la evaluación de la eficiencia del reactor construido, fue necesario la adquisición de un conocimiento previo sobre la metodología disponible para la toma de muestras de hongos y bacterias del aire.

Se comenzó valorando el método más sencillo, la toma de muestra por métodos pasivos, para lo que se eligió una biblioteca universitaria, con alta ocupación de estudiantes, como lugar de muestreo (apartado 4.1.1.). Como soporte se utilizaron dos medios de cultivo y una solución isotónica (tampón PBS). Se sabe que los métodos de muestreo mediante medio de cultivo tienen grandes limitaciones, como pueden ser la existencia de microorganismos incapaces de crecer en el medio seleccionado, los requerimientos de incubación o simplemente que no sean cultivables (se estima que solamente puede cultivarse un 1% de los microorganismos existentes) (Amann y col., 1995). Por otro lado, la aerosolización y las condiciones de estrés en las que se pueden encontrar los microorganismos en el aire (deshidratación, radiación UV, contaminantes químicos) pueden disminuir su capacidad para reproducirse. Algunos de estos microorganismos, no detectados, pueden estar produciendo daños en la salud, de hecho, algunas reacciones alérgicas o de toxicidad son inducidas por restos de microorganismos o especies no vivas (glucanos fúngicos, endotoxinas bacterianas, etc.). Por ese motivo, se buscó complementar la muestra tomada mediante medio de cultivo con una muestra líquida de la que pudiera extraerse directamente el ADN bacteriano independientemente de que los microorganismos allí depositados fueran viables o no. Se consiguió aislar mayor variedad de especies bacterianas mediante medio de cultivo, 20 frente a 5 especies detectadas utilizando el tampón PBS. A pesar de que se realizaron numerosos ensayos y variaciones de la metodología para la extracción de ADN genómico de

la solución de muestreo (tampón PBS) y posterior amplificación del mismo, no se obtuvieron mejoras en los resultados. Esta baja detección de microorganismos tras la amplificación de un fragmento del gen 16S ARNr y posterior DGGE, podría haber sido consecuencia de la hipotética presencia en la solución de muestreo de compuestos inhibidores de la reacción de amplificación procedentes del aire, como pudieran ser contaminantes químicos o altas concentraciones de ADN no bacteriano que inhibieran la actividad polimerasa (Alvarez y col., 1995). Se detectó homología con *Phyllobacterium myrsinacearum* y *Paracoccus denitrificans* que no se habían detectado mediante medio de cultivo, pero que sin embargo si son especies cultivables en Agar nutritivo (Wolfgang y col., 1993; Mergaert y col., 2002). En los siguientes muestreos realizados en Almería, Madrid y Soria, se sustituyó la muestra recogida mediante tampón PBS por una muestra tomada mediante aspiración de aire sobre filtros. De esta manera, se esperaba recolectar mayor cantidad de muestra y aumentar la variedad de especies detectadas.

En el estudio realizado en la facultad de Psicología (apartado 4.1.1), el 62% de las especies bacterianas detectadas fueron Gram+ y el 38% restante, Gram-. En los edificios bioclimáticos se encontró una distribución muy similar, con un 69% de las bacterias identificadas Gram + y el 31% restante, Gram - (apartado 4.1.2). Por lo general se piensa que las bacterias Gram+ son más resistentes al estrés ambiental que las Gram- y menos propensas a la desecación por lo que podría esperarse que el número de bacterias mayoritario detectado perteneciera a este grupo (Flannigan, 1997).

La secuenciación del gen 16S ARNr de las bacterias aisladas en la biblioteca y los edificios bioclimáticos presentaron homología con especies pertenecientes a 4 filos (Phyla), según los datos proporcionados por el NCBI:



Figura 5. 1. Filos de bacterias identificados en los muestreos en la biblioteca universitaria y los edificios bioclimáticos.

En la biblioteca el filo con mayor número de especies identificadas fue Actinobacteria seguido de Proteobacteria, mientras que en los edificios bioclimáticos el mayoritario fue Firmicutes seguido de Proteobacteria y Actinobacteria (Madigan y col., 2009). En los edificios bioclimáticos se detectaron además 2 especies de β -proteobacterias y el resto fueron γ -proteobacterias (16spp), mientras que en la biblioteca apareció una sola α -proteobacteria y el resto fueron γ -proteobacterias (4spp)(figura 5.1). Las proteobacterias son el grupo más numeroso y metabólicamente más diverso de todas las bacterias e incluyen una gran variedad de patógenos. Además, muestran una enorme diversidad de mecanismos de generación de energía y son muy diversas fisiológicamente y morfológicamente. Las Actinobacterias son un grupo de bacterias Gram positivas muy amplio que generalmente se encuentran en la tierra o material vegetal, mientras que el filo Firmicutes, con mayor número de especies en los edificios bioclimáticos, incluye bacterias grampositivas

formadoras de endosporas, como las de los géneros *Clostridium* y *Bacillus* (Tortora y col., 2007; Madigan y col., 2009).

Bacillus subtilis, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Francisella tularensis* y *Planococcus rifietoensis* se identificaron en todos los muestreos de los edificios bioclimáticos independientemente de su localización geográfica. También se detectaron en los dos tipos de soportes utilizados para los muestreos, filtros y medios de cultivo, lo que puede ser indicativo de su ubicuidad en el aire. *B. subtilis* y *E. coli* junto con *B. cereus*, se consideran patógenos alimentarios, de hecho, *E. coli* es habitante intestinal de humanos y otros animales y responsable de algunas infecciones del tracto urinario femenino. *Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno oportunista y causante de infecciones nosocomiales (Madigan y col., 2009) y *F. tularensis* es el patógeno responsable de la tularemia en humanos. En un estudio realizado sobre la diversidad microbiológica de la atmósfera de dos ciudades americanas (Austin y San Antonio) se encontró gran diversidad de microorganismos del tipo de *Francisella* (Brodie y col., 2007). En este estudio, *F. tularensis* y *E. coli* se detectaron únicamente en muestras interiores. Otros patógenos detectados en este trabajo y que también se manifestaron exclusivamente en aire interior fueron *Shigella dysenteriae*, *Corynebacterium diphtheriae* y *Streptococcus pneumoniae*, que son los agentes causantes de la disentería, difteria y neumonía neumocócica o meningitis, respectivamente (Brodie y col., 2007; Kharseeva y col., 2012; Mandal, 2012). *Streptococcus*, es un género cuyas especies originan muchos tipos de enfermedades en humanos, de hecho, *S. pyogenes* causa desde faringitis a infecciones severas invasivas (Terao, 2012). Además se detectó *Serratia marcescens* que puede ocasionar infecciones urinarias y nosocomiales (Bosi y col., 1996).

En contraste, *Staphylococcus aureus* se detectó solamente en aire exterior siendo esta especie causa de infecciones de heridas quirúrgicas, meningitis, neumonía y artritis entre otras patologías (Tortora y col., 2007; Madigan y col., 2009). Curiosamente, el resto de especies del género *Staphylococcus* detectadas, se aislaron únicamente en aire interior.

La fuente de bacterias más importante en el interior de los edificios, son precisamente sus propios ocupantes (Pastuszka y col., 2000). En este trabajo, se observó que 38 de las 67 especies bacterianas detectadas, aparecieron únicamente en aire interior, mientras que en aire exterior, solo hubo tres especies que no se detectaron en el interior de los edificios. La mayor variedad de especies bacterianas detectadas puede tener relación directa con la concentración de personas en los ambientes cerrados muestreados durante la jornada laboral. Sin embargo, los géneros de hongos identificados, no mostraron diferencias destacables con respecto a los de interior. Por lo general, se acepta que la principal fuente de hongos es el aire exterior, si no hay reservorios interiores, por lo que los resultados obtenidos en este trabajo corroboraron dicha suposición (Shelton y col., 2002; Hargreaves, 2003).

En un estudio realizado en Polonia, se muestrearon bioaerosoles en hogares y oficinas y se identificaron, entre otras especies: *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. firmus*, *B. megaterium*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *S. aureus*, *S. saprophyticus*, *S. xylosum*, *S. lentus*, *S. epidermidis*, *Serratia sp.*, *Streptomyces sp.*, *Micrococcus luteus*, *Alcaligenes faecalis*, *Aerococcus viridans*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Corynebacterium sp.*, *Nocardia asteroides* y *Streptococcus sp.* detectadas también en nuestro estudio. Se determinó que *Micrococcus* estaba presente en todas las viviendas y oficinas analizadas, constituyendo el 36% de

todos los géneros identificados. *S. epidermidis* fue la segunda especie aislada con mayor frecuencia (76% de las viviendas), con una representación del 14% de los géneros hallados. Ellos concluyeron que la flora bacteriana de las viviendas debe estar dominada por micrococcos asociados a escamas de la piel (Pastuszka y col., 2000). En este trabajo, *S. epidermidis*, se detectó únicamente en Almería, mientras que *Micrococcus luteus* se identificó en muestras de Almería, Soria, en la biblioteca de Madrid y en estudios posteriores, realizados en Madrid, mediante métodos de muestreo por impacto en placa. Las especies de *Micrococcus* pueden aislarse de la piel, pero son mucho más frecuentes en el suelo y el polvo mientras que *S. epidermidis* se encuentra habitualmente en la piel o en las mucosas (Madigan y col., 2009).

El género con mayor número de especies detectadas fue *Bacillus* que tiene la habilidad de formar endosporas protectoras permitiendo al microorganismo tolerar condiciones ambientalmente extremas, como las que se dan en el aire (Atrih, 2002).

Con respecto al soporte utilizado para el muestreo y el método de separación de los fragmentos del gen 16S ARNr, se observó que en los filtros en los que una vez extraído el ADN y amplificado el gen 16S ARNr se llevó a cabo una clonación de dicho gen en células competentes, se consiguió obtener secuencias pertenecientes a 50 bacterias diferentes, número similar al obtenido mediante el aislamiento en medio de cultivo y amplificación directa del gen 16S ARNr (49 especies) (apartado 4.1.2). Sin embargo, el número de secuencias obtenidas cuando se realizó un gel de gradiente desnaturizante (DGGE) para separar los fragmentos del gen 16S ARNr, fue considerablemente menor, 14 secuencias. Además, todas las especies con las que presentaron homología según las bases de datos del NCBI, habían sido detectadas en las muestras aisladas en medio de cultivo.

De los filtros en los que se practicó la clonación, se obtuvieron 15 secuencias (de un total de 64 secuencias) que presentaron homología con especies bacterianas que no se habían aislado en medio de cultivo en este estudio. Entre ellas, se encontró homología con los patógenos *Corynebacterium diptheriae* y *Streptococcus pneumoniae*. Por otro lado, en las muestras procedentes de medio de cultivo, se aislaron 10 especies, que no presentaron coincidencias con las muestras procedentes de filtros. Como pudimos constatar en esta primera parte del trabajo, para estudios ambientales completos, es recomendable utilizar distintos métodos de toma de muestra que permitan recolectar una mayor variedad de especies. Sin embargo, por cuestiones económicas y de tiempo, y debido a que los análisis no requerían altos niveles de identificación, en estudios posteriores, se muestreó únicamente mediante medio de cultivo.

En nuestra vida diaria, no existen ambientes libres de hongos, ya que estos son capaces de sobrevivir e incluso en ocasiones, proliferar, en condiciones de alta temperatura (60°C) o baja (-5°C), actividad de agua limitada, pH bajo (1) o alto (9) y baja concentración de oxígeno (Chao, 2002). En los edificios bioclimáticos se identificaron los géneros u órdenes más comunes en aire interior: *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus* y *Penicillium*, se consideran hifomicetos dominantes en muestras de aire de muchas regiones, en interiores y exteriores y en diferentes estaciones. Junto con levaduras, y otros géneros como *Aureobasidium*, *Epicothium*, *Ulocladium* y *Trichoderma* se han aislado de edificios de oficinas (Chao, 2002; Salonen y col., 2007), universidades (Saldanha, 2008), edificios con diferentes localizaciones en Estados Unidos (Shelton y col., 2002), restaurantes (Rajasekar y col., 2011), hogares (Sen y col., 2009), etc. Se sabe que algunas de sus

especies producen reacciones alérgicas e inflamaciones y son capaces de liberar micotoxinas (Flannigan, 1997; Cabral, 2010).

Pastuszka y colaboradores, identificaron en su estudio entre otros géneros a *Cladosporium*, *Alternaria* y *Penicillium* como los más representativos. En viviendas con humedades, *Penicillium aurantiogriseum* llegaba a constituir el 90% de los hongos detectados mientras que en viviendas sin reservorios, *Cladosporium* y *Penicillium* constituían entre el 3 y el 49% de los géneros identificados. Se piensa que estos géneros son responsables del desarrollo de rinitis alérgica y asma (Pastuszka y col., 2000).

Alternaria, *Cladosporium* y *Epicoccum*, son hongos dematiáceos, caracterizados por el color oscuro de sus hifas, debido a la presencia de melanina, propiedad que les permite ser más resistentes a la radiación UV (Ellis, 1971). Estos géneros predominaron en los muestreos de Almería y Soria que se realizaron en los meses de verano, con mayor número de horas de insolación (para una descripción más detallada de los géneros identificados, ver anexo I).

La visualización al microscopio óptico de las diferentes cepas de hongos, aisladas en los muestreos descritos en este capítulo, no permitieron llegar a nivel de especie. Sin embargo, la identificación por métodos moleculares, proporcionó información valiosa sobre las especies aisladas en aire interior en una pequeña parte de la muestra (una descripción de las cepas identificadas puede encontrarse en el anexo I). Gómez de Ana y colaboradores identificaron en su estudio llevado a cabo en 22 hogares de Barcelona, las especies de *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor*, *Cladosporium cladosporioides* y *Penicillium chrysogenum*, identificadas en el presente estudio gracias a la secuenciación de las regiones ITS, como especies predominantes que junto con *Cladosporium herbarum* constituían el 15% de las cepas aisladas en aire interior (de Ana y col., 2006). Las especies *A. niger*, *A. versicolor*, *P. chrysogenum*, *P. corylophilum*, *A. pullulans*, *A. alternata*, *E. nigrum* y *C. cladosporioides* también fueron identificados mediante PCR cuantitativa por Meklin y colaboradores en un estudio realizado en 17 hogares de Cincinnati (EE.UU.) (Meklin y col., 2007).

Todas las levaduras identificadas en este estudio pertenecieron al filo *Basidiomycota*, exceptuando *Candida* que pertenece al filo *Ascomycota*. *Cryptococcus* crece en cultivo como levadura, siendo éste el estado anamorfo del hongo. Las formas sexuales son hongos filamentosos que se clasifican en el género *Filobasidiella*. *Rhodotorula* es una levadura ambiental muy común que se encuentra en aire, suelo, masas de agua, productos alimenticios, etc. y también puede colonizar plantas y animales. *Candida* es causante de infecciones oportunistas en todo el mundo y a las infecciones causadas por este hongo, se les suele denominar candidiasis. Habita en la piel, membranas mucosas y boca humanas así como en hojas de las plantas, flores, agua y suelos (Grinberg y col., 1970). *Candida* y *Rhodotorula* fueron identificadas en hogares de Polonia en el estudio llevado a cabo por Pastuszka y colaboradores (Pastuszka y col., 2000). A pesar de la gran proporción de levaduras presentes en muestras de aire interior, en la mayor parte de los trabajos existentes en la bibliografía no se lleva a cabo una identificación de las mismas. La exposición doméstica a *Candida* está relacionada con algún caso de neumonitis por hipersensibilidad (Serrano y col., 2010).

Mediante el método de muestreo pasivo empleado en este trabajo, se consiguió recolectar una muestra correspondiente a 12 horas. Sin embargo, a pesar de la ventaja de recoger una fracción horaria más amplia, presenta el inconveniente de que se pueden estar recogiendo preferentemente los microorganismos con mayor masa, capaces de sedimentar en las placas. Por este motivo, y sobre todo por la necesidad de cuantificación de los microorganismos muestreados, en ensayos posteriores se eligieron métodos de muestreo activos por impacto en placa.

5.2. EVALUACIÓN DE MUESTREADORES POR IMPACTO EN PLACA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS

El uso de muestreadores por impacto en placa de alto caudal está muy extendido ya que son capaces de recolectar grandes volúmenes de aire en tiempos cortos además de ser de fácil uso y transporte, ligeros y permitir llevar a cabo muestreos en salas limpias y otros lugares donde se esperan niveles de contaminación muy bajos. Otros muestreadores como el impactador BioStage de una sola etapa, que se corresponde con la etapa sexta del muestreador Andersen (Andersen, 1958), funcionan a caudales más bajos (28.3L/min) y aunque ahora se fabrica para el mismo una bomba con batería interna, durante años ha dependido de conexión eléctrica lo que limitaba las zonas de muestreo. Sin embargo, este tipo de muestreador, utilizado desde los años 50, ha sido recomendado como muestreador estándar y de hecho la mayoría de estudios de evaluación de muestreadores de aire, utilizan el muestreador Andersen para valorar otros impactadores (Dillon y col., 2005; Zhen y col., 2009). En este estudio se compararon tres tipos de muestreadores similares capaces de trabajar a caudales de 100L/min o superiores.

Los valores de UFC/m³ medios recogidos por el muestreador SAMPL'AIR fueron similares a los recogidos con los muestreadores SAS, mientras que el SPIN AIR si que presentó diferencias significativas con respecto a uno de los cabezales de los muestreadores SAS. Las concentraciones medias de los muestreadores SPIN AIR, permanecieron estables en cada una de las posiciones ensayadas, mientras que los valores del SAS fueron variables y siempre menores que para el SPIN AIR. El muestreador SPIN AIR, presentó mucha menor dispersión en los datos que los muestreadores SAS en el mismo experimento.

Los muestreadores SAS presentaron un coeficiente de variación mayor. Es posible que esté ocurriendo una distribución desigual de aire entre los dos cabezales de los muestreadores, lo que explicaría, aun no siendo estadísticamente significativo, la diferencia en la recolección de datos entre ellos. Puesto que estos muestreadores disponen de una sola bomba de aspiración para dos cabezales, se tienen sospechas de que el caudal del aire al pasar a través de ellos no sea exactamente de 180L/min para cada cabezal. Este problema queda resuelto en la configuración del muestreador SPIN AIR, en el que cada cabezal dispone de su propia bomba de aspiración.

En anteriores muestreos y experimentos de laboratorio se han sospechado fallos en el funcionamiento de los muestreadores SAS, lo que lleva a realizar múltiples réplicas para obtener valores medios de UFC fiables. Errores en el funcionamiento de los muestreadores SAS pueden contribuir a un mayor coeficiente de variación y a una menor reproducibilidad. Hay cierta concordancia en la literatura con respecto a la subestimación en el número de UFC recolectados por el muestreador SAS de un solo cabezal (Mehta, 1996; Bellin, 2001).

Bellín y colaboradores publicaron que en cinco ocasiones a lo largo de un año, el muestreador SAS de un solo cabezal recuperaba menores niveles de propágulos fúngicos que el muestreador Andersen N6. Sin embargo, en la mayoría de los muestreos, dicha subestimación resultó no ser estadísticamente significativa (Bellin, 2001). En un estudio llevado a cabo para determinar los parámetros biológicos y físicos que afectaban a la enumeración de bioaerosoles muestreados con impactadores transportables, se compararon 7 muestreadores de este tipo, entre ellos el SAS SUPER 180, con el BioStage. Este último, resultó tener una eficiencia significativamente mayor en la recolección de bacterias que el resto de muestreadores ensayados. Para el muestreo de hongos, el BioStage funcionó mejor excepto cuando se muestreó un bioaerosol de *Cladosporium cladosporoides*, para el que los muestreadores MAS-100 y SAS SUPER 180 proporcionaron mejores recolecciones. Concluyeron que los muestreadores RCS High Flow y el SAS Super 180 a menudo tenían eficiencias relativas bajas (Yao y col., 2006a).

Otras características del diseño de los muestreadores que influyen en su eficiencia son la distancia entre el orificio y la superficie de agar, la velocidad del aire al entrar por el agujero, el tamaño de orificio y su número. Los muestreadores SPIN AIR y SAMPL'AIR tienen el mismo diámetro de orificio (0.7mm), mientras que para el DUO SAS, este diámetro es algo mayor (1mm). Una distancia demasiado grande entre el orificio y la placa, disminuye la eficiencia de colección, debido a la disipación de las corrientes de impactación, mientras que una distancia demasiado pequeña, puede provocar que las partículas queden demasiado embebidas, si la velocidad de entrada del aire es alta. El impacto de una biopartícula en la superficie de agar supone un estrés para la misma, pero además, una vez que se encuentra embebida en el medio, queda sometida al estrés por desecación provocado por el aire que sigue circulando sobre ella. Estos factores afectan a la viabilidad y capacidad de crecer en un medio de cultivo de los microorganismos recolectados. Por otro lado, se piensa que partículas que no se han embebido lo suficientemente en el medio de cultivo, tienen mayor dificultad para obtener nutrientes y agua del mismo, así como, las partículas que quedan demasiado embebidas, por encima de 3mm, no son capaces de crecer (Reponen y col., 1998). Como puede observarse en la tabla 2.2 del apartado 2.3.1 la velocidad del aire a su paso por los cabezales de los impactadores DUO SAS y SAMPL'AIR es muy parecida, 17.44 m/seg y 16.95 m/seg respectivamente, mientras que para el SPIN AIR, es algo menor, 10.85m/seg. La menor velocidad del aire, en el caso de éste último impactador, puede haber favorecido que los microorganismos sufran un impacto con la placa menos violento que con los otros muestreadores y que la desecación sufrida por el aire tras el impacto haya sido menor, favoreciendo su viabilidad.

Se ha observado que el medio de cultivo de placas utilizadas para muestrear con el DUO SAS, tenían marcas de impactación del aire notablemente mayores que las placas utilizadas en los muestreadores SPIN AIR y SAMPL'AIR. Por otro lado, un medio más seco y duro, debido a la desecación por el paso del aire, provoca efecto rebote de las partículas por lo que son recomendables tiempos de muestreo más cortos para los muestreadores SAS. El mayor número de UFC recogidas por el muestreador SPIN AIR, podría estar relacionado también con el mayor número de orificios de sus cabezales, 400, frente a 256 del SAMPL'AIR o 219 de los muestreadores DUO SAS. En estudios llevados a cabo con el muestreador ANDERSEN se ha sugerido que es recomendable utilizar impactadores con el mayor número de agujeros posible, ya que esto minimiza la probabilidad de que dos partículas caigan en un mismo punto (Macher, 1989).

Un inconveniente del muestreador DUO SAS es el modo de apertura y cierre de los cabezales para introducir las placas con medio de cultivo en su interior, funcionan mediante rosca, lo que ralentiza la toma de muestras simultáneas. Los muestreadores SPIN AIR y SAMPL'AIR disponen de cabezales que se cierran a presión.

El muestreador SAMPL'AIR recogió niveles de UFC similares a los recogidos por el muestreador DUO SAS. Una desventaja del primero, es la posesión de un solo cabezal, aunque pueden conectarse varios al mismo tiempo mediante control remoto. Este muestreador cumple la norma ISO 14698-1 (2003), que proporciona un método para valorar la eficiencia de muestreadores de aire (ISO 14698-1, 2003). El muestreador SPIN AIR recuperó el mayor número de UFC, sin diferencias significativas entre sus cabezales y con el menor coeficiente de variación, por ello, parece ser el más preciso de los tres muestreadores. Además, permite utilizar la rotación de la placa, lo que evita correcciones del número de colonias posteriores. Sin embargo, el trabajo continuado con este tipo de muestreadores puso en evidencia que se producían con el tiempo frecuentes fallos mecánicos y electrónicos que impedían su uso en muestreos de larga duración.

En trabajos sucesivos, se emplearon los muestreadores DUO SAS SUPER 360, con un número mínimo de 3 replicas que permitieran obtener resultados fiables de sus medidas. Se tomaron muestras sucesivas de 200L, cambiando la placa con medio de cultivo entre muestra y muestra, hasta alcanzar un volumen final de 1000L. De esta manera, se evitó muestrear volúmenes demasiado pequeños, que pueden dar lugar a mayor variabilidad entre muestras con resultados no representativos de la microbiota, y al mismo tiempo minimizar la deshidratación de las muestras o su saturación (Saldanha, 2008).

5.3 CARACTERIZACIÓN ESTACIONAL DE HONGOS Y BACTERIAS DE AIRE INTERIOR EN DOS EDIFICIOS DE EDADES DIFERENTES.

Se llevó a cabo un muestreo de hongos y bacterias en aire interior y exterior de dos edificios de edades diferentes durante un año. Ambos edificios tenían la misma localización geográfica y lindaban con la misma carretera, encontrándose a una distancia de 200 metros el uno del otro. Pertenecían a la región mediterránea y se diferenciaban en los materiales utilizados en su construcción, el aislamiento de las ventanas, la eficiencia de filtración del aire y el sistema de aire acondicionado y calefacción que poseían. Durante los muestreos e inspecciones previas, no se encontraron signos de humedades ni crecimiento de microorganismos en paredes o sistemas de aire acondicionado y calefacción. Ambos edificios formaban parte de un complejo de edificios dedicados en su mayoría a investigación que se encuentra rodeado de parques arbolados.

Durante el invierno se abrieron menos las ventanas, en ambos tipos de edificios, y el sistema de calefacción estuvo encendido durante toda la jornada laboral. En primavera y otoño primó la ventilación natural en el edificio antiguo, mientras que en el edificio moderno se mantuvo la ventilación mecanizada durante todo el año. En verano, en ambos tipos de edificios se mantuvo el sistema de aire acondicionado encendido durante toda la jornada laboral. Durante los muestreos, los trabajadores que tenían su puesto de trabajo en los puntos seleccionados, llevaron a cabo sus actividades de manera habitual.

El edificio más antiguo, presentó en la mayoría de las muestras tomadas una mayor carga microbiana que el edificio moderno, tanto en el interior como en el exterior del mismo. Los mayores niveles de hongos y bacterias detectados en el exterior del E.A., sobre todo en invierno, donde se alcanzó un máximo de 2012 UFC/m³ de hongos y 1261 UFC/m³ de bacterias, podrían haber sido la causa de los mayores niveles interiores detectados con respecto al otro edificio. En invierno, se esperaban concentraciones exteriores inferiores al resto de estaciones, como ocurrió en el caso del E.M., debido a las temperaturas más bajas, lo que dificulta la proliferación de microorganismos. También se esperaban unas mayores concentraciones interiores, debido a la disminución de la ventilación natural (se abren menos las ventanas debido al frío exterior y disminuye la dilución de los contaminantes del aire). Los niveles exteriores más altos que en el E.M., situado solo a 200 metros, indicaron que pudiera haber habido una fuente externa de bioaerosoles en los alrededores del edificio. El hecho de que este edificio se encontrara en un espacio más abierto que el E.M., podría ser una causa. También cabe la posibilidad de que se hubiera muestreado bioaerosoles procedentes de una depuradora situada en la cercanía, a 1,4 km aproximadamente hacia el oeste del citado centro de investigación y para los que el E.A., debido a su localización, se encontraba más expuesto.

Para ambos edificios, las concentraciones medias interiores de bacterias fueron, por lo general, superiores a las exteriores. Como se ha comentado anteriormente, se considera que el hombre es el principal portador de bacterias en el interior de los edificios, por lo que esto explicaría que durante las jornadas de trabajo los niveles de bacterias aumenten dentro de los mismos. Por otro lado, en el edificio antiguo, existía una zona clausurada a la que no accedían los servicios de limpieza, acumulándose polvo y suciedad.

El edificio moderno, de nueva construcción era visiblemente más hermético que el edificio antiguo, en el que debido a su edad, su estructura podría encontrarse más laxa. El tipo de ventanas de este último edificio, de aluminio y correderas, no permitía el cierre completo de las distintas estancias del edificio, mientras que en el edificio moderno se instalaron ventanas practicables que aislaban y protegían de la luz UV. Por otro lado, en el edificio más antiguo, se abrían las ventanas con mayor frecuencia, por lo que todo ello pudo haber contribuido a una mayor entrada de bioaerosoles en el interior.

Con respecto a los niveles medios de UFC/m³ de hongos cabe destacar que al contrario de lo que ocurrió con bacterias, fueron mayores en el exterior que en el interior, para ambos edificios, exceptuando la primavera en el edificio antiguo. Se acepta que la mayor parte de hongos encontrados en el interior proceden del exterior del edificio, sobre todo en edificios con ventilación natural. La concentración de esporas fúngicas en el aire ambiente puede variar dependiendo del clima, el momento del día y la estación del año. Huang y colaboradores confirmaron que la distribución de hongos parece estar asociada a cambios estacionales en Taiwán y las concentraciones aparentemente fueron mayores en verano que en invierno en algunos ambientes de trabajo y residencias (ChuYun y col., 2002).

En este caso, parece que los sistemas de filtración del aire entrante en ambos edificios, permitieron en la mayoría de los casos que los niveles interiores no se igualaran a los exteriores. Una mayor concentración de hongos interior puede ser señal de la existencia de un foco de crecimiento de hongos en algún punto, cuyas esporas pueden estarse difundiendo por todo el edificio a través del sistema de aire acondicionado y calefacción. Esto pudo haber ocurrido en primavera en el E.A. donde en 5 de los puntos muestreados, se

dieron niveles de hongos extraordinariamente elevados (entre 1800 y 2700 UFC/m³). Cabe destacar que el resto de puntos que presentaron niveles de hongos normales, o no poseían ventilación mecanizada, como es el caso de los pasillos, y el cuarto de baño muestreados, o contaban con un sistema de calefacción y aire acondicionado independiente del resto.

La disponibilidad de agua y la temperatura son factores ambientales críticos en el control del crecimiento de microorganismos en interiores. En ambos edificios la humedad relativa interior se mantuvo por debajo del 30% y la temperatura se conservó por debajo de 25°C en la mayoría de los puntos muestreados. Con humedades relativas por debajo del 30% el crecimiento interior de hongos es mucho menos probable que con HR altas (Burger, 1990).

Debido a la ausencia de guías interpretativas numéricas para bioaerosoles, una comparación de aire interior con el exterior es importante para decidir si el ambiente interior estudiado es típico o por el contrario pueden sospecharse fenómenos de amplificación interior (Yang y col., 2007). Al valorar la relación interior/exterior tanto de hongos como de bacterias, se percibió que los puntos que sobrepasaban con mayor frecuencia los valores recomendados por la norma eran los cuartos de baño y los pasillos. Este hecho tendría su explicación en la mayor circulación de personas en los mismos que en su movimiento habrían provocado corrientes de aire o vibraciones y que además eran portadoras de bacterias. Este fenómeno habría dado lugar a la resuspensión en aire de los microorganismos depositados en el suelo u otras superficies, así como al incremento en la liberación de esporas de hongos (Gorny y col., 2002). En el edificio antiguo, además el cuarto de baño muestreado tuvo permanentemente la ventana abierta debido a los malos olores que se generaban en el mismo, por lo que el aporte de aire exterior fue mayor.

En verano, en el E.A. se incumplió la norma UNE 171330-2 en la mitad de los puntos en los que se muestrearon bacterias y en primavera, en 8 de los 10 puntos en los que se muestrearon hongos. En el E.M., destacó la estación de invierno, donde 7 de los 8 puntos analizados superaron la norma en el caso de bacterias, lo que podría tener su explicación en los menores niveles exteriores detectados. Las UFC/m³ de bacterias sobrepasaron en el edificio antiguo las 800 UFC/m³ recomendadas por la norma UNE 100012 en un solo punto en otoño. También se incumplió en la primavera en 5 de los puntos en los que se muestrearon hongos (UNE 100012, 2005; UNE 171330-2, 2009a).

En un estudio desarrollado en la Comunidad de Madrid en el año 2000, a 1.3 km al sur de los dos edificios muestreados, se llevó a cabo un recuento e identificación de esporas fúngicas en una terraza de una facultad universitaria, a 18m del suelo, mediante el método volumétrico continuo no selectivo (Burkard). Se detectó una media diaria de 355 esporas/m³ y un máximo en el mes de mayo de 3.335 esporas/m³. Los niveles volvieron a ser elevados en otoño-invierno. Este estudio confirmó la presencia atmosférica, durante todo el año de *Cladosporium* y *Alternaria*, constituyendo el 49% y el 5% respectivamente del total de esporas fúngicas y siendo los grupos con mayor presencia atmosférica junto a *Ustilago*. Encontraron máximos de ambos géneros en primavera y otoño y mínimos en los meses invernales. También confirmaron que *Aspergillus* y *Penicillium* se encontraban de manera permanente en el aire ambiente (Sáenz y col., 2003).

En nuestro estudio, se confirmó la presencia en los edificios muestreados y sus alrededores de géneros de hongos comunes en el aire (Samson y col., 2004b). Los grupos

mayoritarios, para los que su frecuencia en nuestras muestras se presenta en las gráficas 4.25 y 4.26 fueron *Cladosporium*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus* y las levaduras.

Cladosporium estuvo mejor representado en primavera, tanto en el interior como en el exterior de ambos edificios, como ocurrió en el estudio llevado a cabo por Lee y colaboradores en hogares familiares de Cincinnati (Lee y col., 2006). *Alternaria*, se aisló predominantemente en primavera, seguida del verano, en el caso del E.A. y en verano en el caso del E.M. seguida de la primavera. En el estudio anual realizado en 2002, en las proximidades al centro de investigación, se encontraron las concentraciones mayores de *Cladosporium* en aire exterior también en primavera, aunque con un segundo máximo en el mes de octubre. Este hongo produce abundantes conidios con un máximo de concentración en las últimas semanas de verano y primeras de otoño (Bial-Arístegui, 2002).

Alternaria se detectó de forma constante a lo largo del todo el año, con mayor incidencia en los meses de mayo y junio (Sáenz y col., 2003). En Barcelona en 2006 se detectaron los mayores niveles de *Cladosporium* en aire interior en otoño mientras que *Alternaria* predominó ligeramente en verano, seguido del otoño (de Ana y col., 2006). *Cladosporium* y *Alternaria* se aíslan fundamentalmente de la superficie de plantas (Samson y col., 2004b), por lo que las diferencias en los niveles detectados de ambos géneros entre los dos edificios pudo estar relacionado de la cantidad y tipo de vegetación que los rodeaba.

Penicillium se detectó en mayores concentraciones, tanto en el interior como en el exterior, en otoño seguido de invierno en el E.A., y a la inversa en el edificio moderno, en el que se aislaron niveles mayores en invierno seguido de otoño. Gómez de Ana y col. detectaron los mayores niveles en otoño en interiores y en invierno en exteriores (de Ana y col., 2006). Cabe destacar que en el edificio antiguo, los niveles interiores siempre fueron mayores que los exteriores, sobre todo en las citadas estaciones. *Aspergillus* se aisló con mayor frecuencia en verano y otoño, mientras que en invierno, no se detectó en el exterior de ninguno de los dos edificios. Gómez de Ana y colaboradores detectaron a *Aspergillus* con mayor frecuencia en otoño y menor en invierno, en sus muestras interiores, mientras que en el exterior, fue mayoritario en verano (de Ana y col., 2006). *Penicillium* y *Aspergillus* se han detectado como los dos géneros más frecuentes en apartamentos de Austria con crecimiento de hongos visible en su interior (Haas y col., 2007).

Cladosporium y *Alternaria* son capaces de producir asma y alergias en las personas expuestas a ellos (Cobe, 1932; Plaza y col., 2003; Bouziane y col., 2005), *Aspergillus* es causante de micosis respiratorias graves y alergias (Germaud, 2006) y *Penicillium* también se asocia con casos de alergias y reacciones de toxicidad.

En el E.M. hubo mayor proporción de levaduras en el interior que en el exterior, en todas las estaciones, mientras que en el E.A. este hecho ocurrió en verano y otoño únicamente, detectándose los mayores niveles tanto exteriores como interiores en el invierno.

5.4. ENSAYOS FOTOCATALÍTICOS Y FOTOLÍTICOS A ESCALA DE LABORATORIO

La primera complicación que surge al evaluar los estudios fotocatalíticos realizados en aire interior mencionados en la bibliografía es la carencia de datos suficientes sobre la extrapolación de los ensayos realizados en el laboratorio a ambientes reales. La mayoría de

ensayos evalúan los efectos de tratamientos realizados en condiciones ambientales controladas, sobre un solo microorganismo o mezclas de 4 o 5 diferentes, que pese a aportar una información valiosa, requieren de su validación en aire interior real. En los ambientes interiores en los que pasamos la mayoría de nuestro tiempo, coexisten gran variedad de contaminantes químicos y biológicos y se requiere una eliminación simultánea de todos ellos. Por otro lado, con respecto al diseño de reactores, existen múltiples variables para las que no existe estandarización, como la intensidad de la radiación UV, el tipo y cantidad de catalizador, los soportes utilizados, la geometría del reactor, así como la manera de efectuar el ensayo y determinar la eficiencia de los tratamientos. Por ello, los resultados obtenidos son muy dependientes de las condiciones en las que se efectuó el ensayo, lo que dificulta la comparación entre diferentes estudios.

En los ensayos que se llevaron a cabo a nivel de laboratorio con un reactor tubular, se observó que un aumento de potencia de las lámparas incrementaba ligeramente la capacidad fotolítica de las mismas, aunque no fue estadísticamente significativo en el caso de la luz UV-A. Cuando se añadió el fotocatalizador al reactor su eficiencia con lámparas de UV-A, llegó a alcanzar valores similares a los de UV-C, lo que apuntaba a que la fotocatálisis con radiación UV-A podría ser competitiva con la fotólisis con luz UV-C para la desinfección de bacterias en aire. Teniendo en cuenta los altos valores de caudal, 180L/min del muestreador utilizado (DUO SAS SUPER 360) que determinaba un tiempo de residencia de las partículas en el interior del reactor de tan solo 0,12 seg, los resultados fueron muy prometedores. En el caso de los ensayos con luz UV-C y el fotocatalizador no se acentuó el efecto bactericida.

A pesar de que los mecanismos de la degradación fotocatalítica no se conocen con exactitud, el trabajo experimental de algunos investigadores revelan las posibles vías por las que los radicales hidroxilo y otras especies reactivas de oxígeno, llegan a interrumpir la cadena de transporte de electrones, bloqueando así la actividad respiratoria de la célula bacteriana (Matsunaga y col., 1988; Saito, 1992; Sunada y col., 1998; Maness y col., 1999). Algunas especies que soportaron el tratamiento tienen ciertas propiedades que les confieren una mayor resistencia lo que podría explicar su supervivencia, como *Bacillus sp.* que forma endoesporas capaces de resistir condiciones extremas como calor, desecación, radiación o desinfectantes y que pueden sobrevivir miles o incluso millones de años en estado latente (Atrih, 2002). *M. luteus*, se encuentra comúnmente en piel humana, agua, polvo y suelo y sus células, como ocurre también con otros miembros del género, poseen numerosas adaptaciones para sobrevivir en ambientes extremos, pobres en nutrientes, características que ayudan a su persistencia y dispersión en el ambiente (Greenblatt, 2004).

El reactor, en ninguna de sus configuraciones, fotocatalítica o fotolítica con luz UV-A o UV-C, consiguió disminuir la cantidad de hongos en las muestras tratadas. Esto pudo deberse a que los hongos son capaces de formar un gran número de esporas, difíciles de eliminar debido a la complejidad de sus paredes celulares. Estas paredes se caracterizan por ser más gruesas, con capas adicionales o por poseer pigmentos como la melanina, que absorben la luz UV. Por otro lado el bajo contenido en agua, la baja tasa de metabólica, así como su alto contenido en sustancias de reserva, les permite sobrevivir largos periodos en estado latente (Deacon, 1997b)

Estudios sobre la inactivación fotocatalítica de hongos indican que son necesarios tiempos de irradiación largos (Lonnen, 2005; Sichel, 2007). Vohra y colaboradores utilizando filtros impregnados de TiO_2 , vieron un 78% de destrucción fotocatalítica de esporas fúngicas en 24 horas y alrededor del 91% en 36 horas, mientras que para la inactivación completa de esporas de *Aspergillus niger*, necesitaron 48 horas (Vohra y col., 2006). Chen y colaboradores, utilizando intensidades de luz UV-A de 10W/m^2 vieron en 38 horas una reducción de únicamente el 62% de esporas de *A. niger* depositadas en una superficie impregnada de TiO_2 mientras que con luz UV-C de 1mW/cm^2 vieron una reducción del 80% de esporas en 15 minutos (Chen, 2009).

5.5. ENSAYOS FOTOLÍTICOS Y FOTOCATALÍTICOS A ESCALA DEMOSTRACIÓN

Con la configuración del reactor a escala de demostración, en la que planchas de monolito alternaban con las lámparas, se buscó minimizar lo más posible la existencia de zonas de sombra en el catalizador inactivas fotocatalíticamente. Así como anteriormente, con el reactor a escala de laboratorio, se utilizaron monolitos transparentes de PET que permitían que los fotones de luz UV pudieran llegar a toda la superficie del catalizador, en este caso, a pesar de ser los monolitos opacos, se ha buscado que los fotones llegaran a la mayor superficie posible. Por otro lado, la fabricación del reactor en aluminio, permitió que la luz fuera reflejada por todas las paredes interiores del reactor puesto que colocar las lámparas cerca de superficies reflectivas aumenta la intensidad media del campo de UV (Kowalski y col., 2000). Como se ha comentado anteriormente, el diseño del monolito en forma de panel de abeja, permitió al mismo tiempo un mayor contacto de los contaminantes con el catalizador a su paso por el reactor. El impacto de los microorganismos con la superficie activa es crítica, por lo que para diseñar reactores altamente eficientes se debe aumentar la probabilidad de contacto de los microorganismos con la superficie del catalizador (Josset y col., 2010).

Los tratamientos del aire del despacho de mayor duración (4 horas) con 3 lámparas de luz UV-C fueron más eficientes que los tratamientos de 1 o 2 horas. Además, la reducción en el número de colonias se mantuvo, para bacterias, durante las 2 horas siguientes. En general, para la destrucción de bacterias, se observó una ligera tendencia al aumento de eficiencia proporcional al tiempo post-tratamiento, durante al menos 4 horas. La disminución con el tiempo, del número de colonias podría deberse, a la pérdida de viabilidad progresiva de aquellas células bacterianas en suspensión que quedaron dañadas con el tratamiento. Las eficiencias más bajas, a tiempo cero, o las recuperaciones en el número de UFC/ m^3 puntuales, pudieran ser causa de un aporte exterior al despacho, ocasionado con la entrada en el mismo para efectuar la primera toma de muestra. Para disminuir la probabilidad de que nuevos microorganismos procedentes del exterior del despacho falsearan los resultados de los tratamientos, se distanciaron los tiempos de toma de muestra, disminuyendo así el número de veces que se entraba en el despacho, y durante el experimento, la persona que tomaba la muestra, permaneció en un descansillo previo al despacho, aislado del pasillo por una puerta. De esta manera, se consiguieron mejores eficiencias en tratamientos cortos, como el de 2 horas con luz UV-C que mejoró ligeramente sus eficiencias llegando a un 86% como máximo para la destrucción de bacterias y un 90% para la destrucción de hongos. Desde ese momento las eficiencias se mantuvieron hasta 4 horas después del tratamiento.

En los diferentes ensayos realizados se comprobó que cuando los niveles de bacterias y hongos iniciales eran bajos, por debajo de 20 UFC/m^3 , no se observaba el efecto del tratamiento. Probablemente, con concentraciones altas de contaminantes la probabilidad de que algunas bacterias y hongos entraran en contacto con el catalizador a su paso por el reactor era mayor. Al ser el despacho un entorno cerrado (las ventanas están selladas), el aporte microbiano procedía fundamentalmente del pasillo con el que comunicaba y de las personas que entraban en él durante el día. Por otro lado, el despacho se situaba a la izquierda de una de las escaleras de subida a la primera planta del edificio, por lo que había un movimiento activo de personas en el exterior del despacho que accedían o abandonaban sus puestos de trabajo.

Las eficiencias obtenidas en el tratamiento de hongos fueron más bajas en los ensayos en los que se irrumpía en el despacho para la toma de muestra mayor número de veces, sin embargo, los resultados fueron prometedores si los comparamos con los ensayos discutidos en el apartado anterior (5.4), en el que no se consiguió disminuir el número de UFC de hongos con ninguno de los tratamientos realizados con un reactor tubular a escala de laboratorio.

El aumento del número de lámparas encendidas de 3 a 9 de luz UV-C durante 1 hora, no supuso un aumento significativo de la eficiencia para la destrucción de bacterias y hongos. Bajas dosis de luz en tiempos largos de exposición pueden ser más eficientes que altas dosis con menores tiempos de exposición. Con bajos tiempos de exposición, es posible que los mecanismos de supervivencia microbianos se activen y sean capaces de reparar los daños causados por la luz germicida. Para tratamientos de más duración el deterioro producido por la luz UV acaba por superar la capacidad de autoreparación de las células, causando la muerte celular o daños en el ADN que impiden la replicación (Chen, 2009).

Al añadir el catalizador, la eficiencia del reactor, con lámparas de UV-A alcanzó para bacterias eficiencias de entre el 97 y el 99%, sin diferencias significativas con el tratamiento con únicamente luz de longitud de onda corta o para el tratamiento fotocatalítico con luz UV-C que alcanzaron eficiencias del 97-98% y 98-99% respectivamente en ensayos realizados en las mismas condiciones. Con respecto a la eliminación de hongos en aire por fotocátalisis con luz UV-A, los resultados de los tratamientos fueron satisfactorios al iluminar los catalizadores con 9 lámparas de 36W. Las eficiencias fueron menores que para el tratamiento de bacterias aunque llegando a alcanzar valores del 81%. Estos resultados indicaron que podría confiarse en la sustitución de las lámparas de UV-C por lámparas de UV-A añadiendo un catalizador basado en TiO_2 , como el ensayado en este capítulo e iluminando el mismo con 9 lámparas. La mayor complejidad de las paredes celulares de las esporas fúngicas, parece demandar tratamientos más severos que las bacterias para su degradación. Empleando 3 lámparas en lugar de 9 e incrementando el número de catalizadores de 2 a 3, se incrementa la probabilidad de contacto de las esporas con el catalizador. En su viaje a lo largo del reactor, una spora fúngica tendrá que atravesar tres barreras monolíticas iluminadas con lámparas de UV-A, por lo que se multiplica por tres el número de posibilidades de contacto de la spora con las especies reactivas de oxígeno, generadas en la superficie del catalizador como producto de la reacción fotocatalítica.

A pesar de que los trabajos no son plenamente comparables podemos hacernos una idea de la resistencia a los tratamientos fotocatalíticos de diferentes especies de

microorganismos gracias a las investigaciones realizados por Vohra y col. (2005) que demostraron, con un prototipo de reactor fotocatalítico experimental, la destrucción de un 85% de esporas de la bacteria *B. cereus* en las primeras cuatro horas de tratamiento, que llegaba al 99% después de iluminar 24 horas con UV-A. Su fotoreactor inactivaba completamente bacterias menos resistentes como *E. coli* y *S. aureus* a los 60 minutos y 45 minutos respectivamente. Sin embargo, para la eliminación de los microorganismos más resistentes capaces de esporular, necesitaron tiempos de tratamiento más largos, de incluso días, tratando aire en recirculación (Vohra y col., 2006). Con un reactor fotocatalítico tangencial, Josset y colaboradores, consiguieron una eficiencia del 93% en la destrucción de la bacteria *Legionella pneumophila* en un solo pase por el reactor con un caudal de 5m³/h. La empresa BIOWIND group comercializa purificadores de aire basados en éste último reactor (DPA) con una eficiencia del 99.9% para la destrucción de hongos, bacterias, virus y esporas en volúmenes cerrados. Estas unidades constan de uno o dos reactores fotocatalíticos y trabajan a 80 m³/h o 150 m³/h respectivamente (Josset y col., 2007).

En ensayos fotocatalíticos realizados en ambientes reales, con diferentes utilidades, como en el trabajo de Paschoalino y colaboradores, se consiguió una eficiencia del 99% en la inactivación de bacterias después de una hora de operación, utilizando una única lámpara de UV-C de 30W para el tratamiento fotocatalítico con un caudal de 200l/min. Ellos instalaron su reactor en una sala de reuniones de 67m³, utilizada diariamente para las comidas y los cafés por 15 personas. Las altas eficiencias obtenidas con una sola hora de tratamiento, podrían deberse, entre otros motivos, a la menor velocidad del aire a su paso por el reactor, lo que aumenta el tiempo de residencia de los contaminantes en el interior del mismo. Además, observaron mejores eficiencias en el tratamiento fotocatalítico con luz UV-C que en el tratamiento sin catalizador con la misma lámpara. En nuestros ensayos las eficiencias de la fotocatálisis con luz UV-C fueron iguales o ligeramente superiores que la fotólisis, en el tratamiento de bacterias. Estas mejores eficiencias fotolíticas podrían tener su explicación en el mayor número de lámparas utilizadas (4 en lugar de 1), el volumen menor de aire tratado y la mayor duración del tratamiento (4 horas). Su reactor fue también menos eficiente para la desinfección de hongos (Paschoalino y col., 2008). En los reactores en los que se combina luz UV-C con catalizador, se consigue un doble efecto germicida, por lo que se espera que las eficiencias sean mayores. Por otro lado, al ser dañina para la salud, debe encontrarse siempre en entornos cerrados y el acceso a ellas debe ser realizado por personal cualificado con la protección adecuada, lo que limita el acceso al sistema. Para aplicaciones domésticas es preferible el uso de luz UV-A.

En nuestro sistema experimental, pudo haber un efecto sinérgico entre el enfriamiento o calentamiento rápido al que fueron sometidos los microorganismos en su entrada al reactor y el tratamiento fotocatalítico/fotolítico. Es posible que el estrés sufrido en la primera fase del sistema les hiciera más vulnerables al tratamiento posterior. Los ensayos descritos se realizaron durante las cuatro estaciones del año, habiéndose obtenido eficiencias similares en todas ellas. El equipo de aire acondicionado y calefacción adosado al reactor se encuentra encendido de manera permanente habiéndose tomado las muestras control en las mismas condiciones.

Los radicales producidos sobre la superficie de los catalizadores, actúan oxidando las especies orgánicas que entran en contacto con ellos, por ello, además de desinfección se consigue al mismo tiempo descontaminación del aire de químicos no deseables.

Paralelamente al estudio sobre desinfección, se llevó a cabo un análisis de la destrucción de COVs en las mismas condiciones y bajo los mismos tratamientos (datos no mostrados).

En estudios realizados a diferentes humedades relativas en tratamientos con UV-C, se ha visto que, con humedades relativas por encima del 40% se pierde efectividad. En nuestros ensayos la HR nunca superó el 35% (Xu y col., 2003).

Sistemas parecidos al reactor ensayado, fotolíticos o fotocatalíticos con luz UV-C se están instalando en múltiples lugares públicos y privados con necesidad de tratamiento del aire interior. Se localizan en la climatización central para un tratamiento integral del edificio o en los difusores y módulos independientes para un tratamiento de zonas concretas o plantas de edificios. La empresa Aire Limpio S.L. por ejemplo, instala equipos para el tratamiento de aire de un gran número de hospitales, empresas, bancos, restaurantes, etc

6. CONCLUSIONES

De la realización del presente trabajo de Tesis Doctoral se han extraído las siguientes conclusiones:

1. La secuenciación, y posterior comparación con las bases de datos del NCBI, del gen 16S ARNr de bacterias y la observación de las cepas de hongos aisladas al microscopio óptico, han permitido identificar y conocer por tanto, la composición de una pequeña parte de la flora microbiana aérea presente en diferentes edificios de la geografía española. *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Francisella tularensis* han sido aislados en aire interior de cuatro edificios con diferente localización geográfica. Todos ellos son capaces de causar infecciones en humanos, por lo que es importante conocer los niveles en los que se encuentran presentes para poder tomar medidas correctoras en caso necesario.
2. Los géneros de hongos *Cladosporium*, *Alternaria*, *Penicillium* y *Aspergillus*, junto a una alta proporción de levaduras, se han detectado como mayoritarios en las todas las muestras de aire interior tomadas en el presente trabajo, independientemente de la estación del año, tipo de edificio o localización geográfica, lo que es indicativo de su ubicuidad en el aire. En los diferentes muestreos llevados a cabo, se ha puesto de manifiesto la presencia en aire interior de especies bacterianas patógenos de humanos y hongos alérgicos y productores de micotoxinas.
3. La secuenciación de las regiones ITS, de algunas de las muestras tomadas en el edificio de Madrid, ha permitido la identificación hasta el nivel de especie de las cepas de hongos más representativas, así como la identificación de hifomicetos que no habían esporulado y levaduras. Las cepas aisladas en este trabajo presentaron homología con especies de hongos comunes en aire interior como *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Epicoccum nigrum* y con levaduras de los géneros *Cryptococcus*, *Rhodotorula* y *Candida*.
4. El uso de impactadores para la toma de muestra, ha permitido conocer las UFC/m³ de hongos y bacterias presentes en aire interior en el momento del muestreo, para valorar de este modo su posible peligrosidad. La comparación de cuatro impactadores diferentes ha permitido conocer las diferencias en las UFC recolectadas entre ellos, y ha puesto en evidencia la necesidad de tomar precauciones cuando se comparan estudios llevados a cabo con diferentes impactadores.
5. Se han encontrado diferencias significativas al comparar los niveles de hongos y bacterias en aire interior de dos edificios con la misma localización geográfica pero diferente edad. El aire interior del edificio más antiguo ha resultado contener niveles superiores de UFC/m³ medios llegando incluso a cuadruplicar en otoño, los niveles de bacterias del edificio moderno y a ser hasta 35 veces superior en primavera, en el caso de hongos.
6. Mediante la introducción de 7 monolitos de PET transparentes, impregnados con un sol-gel de dióxido de titanio, en un reactor tubular a escala de laboratorio, se han conseguido eficiencias para la eliminación de bacterias de hasta un 69% al

iluminarlos con una lámpara de 8W de UV-A. Los ensayos se han llevado a cabo con un caudal de aire de 180L/min y con un reactor de tan solo 24 cm de longitud.

7. Se ha puesto en marcha un reactor fotolítico/fotocatalítico a escala demostración en un despacho ocupado por una persona y se ha probado su eficiencia para la eliminación de hongos y bacterias de aire interior. Los tratamientos del aire del despacho de mayor duración (4 horas) con 3 lámparas de luz UV-C han resultado ser más eficientes que los tratamientos de 1 o 2 horas. Un aumento del número de lámparas de luz UV-C, de 3 a 9, para tratamientos del aire interior de 1 hora, no ha supuesto un aumento de la eficiencia para la destrucción de bacterias y hongos.
8. Al introducir en el reactor 2 monolitos de aluminio impregnados de un sol-gel de TiO_2 e iluminar el mismo con 3 lámparas de luz UV-A durante cuatro horas, se han conseguido eficiencias de entre el 97 y el 99% para la eliminación de bacterias en aire interior del despacho. Se han obtenido eficiencias similares con el tratamiento sin catalizador con luz UV-C (97-98%) y con el tratamiento fotocatalítico con luz UV-C (98-99%), en ensayos realizados en las mismas condiciones.
9. Aumentando el número de lámparas de luz UV-A de 3 a 9 en el interior del reactor e incrementando el número de monolitos de 2 a 3, se ha conseguido obtener una disminución del 81% en las UFC/m³ de hongos del aire interior del despacho, durante 4 horas del tratamiento.
10. En los ensayos llevados a cabo con un reactor a escala de laboratorio y un reactor a escala demostración, se ha probado que para el tratamiento del aire interior de un área confinada, las lámparas de UV-C, podrían sustituirse por lámparas de UV-A, más seguras para la salud, cuando se introducen en el sistema catalizadores impregnados con un sol-gel de TiO_2 .

7. BIBLIOGRAFÍA

- ACGIH® (2012a). 2012 TLVs® and BEIs®: American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH®).
- ACGIH® (2012b). Guide to occupational exposure values 2012: American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH®).
- AENOR (c) (2010). Normas:
<http://www.aenor.es/aenor/normas/buscadornormas/resultadobuscnormas.asp>. (27-05, 2013)
- Alexopoulos, C. J., Mims, C.W., Blackwell M. (1996). Fungal systematics. Introductory Mycology pp. 61-85.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. y Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410.
- Alvarez, A. J., Buttner, M. P. y Stetzenbach, L. D. (1995). PCR for bioaerosol monitoring - sensitivity and environmental interference. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(10), 3639-3644.
- Amann, R. I., Krumholz, L. y Stahl, D. A. (1990). Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.*, 172, 762-770.
- Amann, R. I., Ludwig, W. y Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in-situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59(1), 143-169.
- Andersen, A. A. (1958). New sampler for the collection, sizing, and enumeration of viable airborne particles. *Journal of Bacteriology*, 76(5), 471-484.
- Andersen, B., Sorensen, J. L., Nielsen, K. F., van den Ende, B. G. y de Hoog, S. (2009). A polyphasic approach to the taxonomy of the *Alternaria infectoria* species-group. *Fungal Genetics and Biology*, 46(9), 642-656.
- Anderson, M. A., Yamazaki-Nishida, S. y Cervera-March, S. (1993). Photodegradation of trichloroethylene in the gas phase using TiO₂ porous ceramic membrane. Ollis, D.F. y H.Al-Ekabi (Eds.), *Photocatalytic Purification and Treatment of Water and Air*: Elsevier Science Publishers B.V. pp. 405-420.
- ARFRISOL. Edificios Proyecto ARFRISOL:
http://www.arfrisol.es/ARFRISOLportal/visualizador_edificios.html. (28-05, 2013)
- ASHRAE.org. Standards and guidelines: <https://www.ashrae.org/standards-research--technology/standards--guidelines>. (27-05, 2013)
- Atrih, A., Foster, S. J. (2002). Bacterial endospores the ultimate survivors. *International Dairy Journal*, 12(2-3), 217-223.
- Avila, P., Bahamonde, A., Blanco, J., Sánchez, B., Cardona, A. I. y Romero, M. (1998). Gas-phase photo-assisted mineralization of volatile organic compounds by monolithic titania catalysts. *Applied Catalysis B: Environmental*, 17, 75-88.
- Avila, P., Montes, M. y Miró, E. E. (2005). Monolithic reactors for environmental applications: A review on preparation technologies. *Chemical Engineering Journal*, 109(1-3), 11-36.
- Bellin, P., Schillinger, J. (2001). Comparison of field performance of the Andersen N6 Single Stage and the SAS Sampler for airborne fungal propagules. *Indoor Air*, 11(1), 65-68.
- Benabbou, A. K., Derriche, Z., Felix, C., Lejeune, P. y Guillard, C. (2007). Photocatalytic inactivation of *Escherichia coli*: Effect of concentration of TiO₂ and microorganism, nature, and intensity of UV irradiation. *Applied Catalysis B: Environmental*, 76(3-4), 257-263.
- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J. y col. (2013). *GenBank*. *Nucleic Acids Res*, 41, 36-42.
- Bial-Arístegui (2002). *Cladosporium herbarum* (Persoon) Link: Fries. *Revista Iberoamericana de Micología*, 27-28.

- Bickley, R. I., González-Carreño, T., Less, J. S., Palmisano, L. y Tilley, R. J. D. (1991). A structural investigation of titanium dioxide photocatalysts. *Journal of Solid State Chemistry*, 92, 178-190.
- Biology-Forums.com - For All Your Science Needs © (2013). Gram+ and Gram+: <http://biology-forums.com/>. (05-03, 2013)
- Bischoff, B. L. y Anderson, M. A. (1995). Peptization process in the sol-gel preparation of porous anatase (TiO₂). *Chem.Mater.*, 7, 1772-1778.
- Blanco, J., Malato, S., Peral, J., Sánchez, B. y Cardona, A. I. (2004). Diseño de reactores para fotocátalisis: evaluación comparativa de las distintas opciones. Blesa, M. A. y Sánchez, B. (Eds.), *Eliminación de contaminantes por fotocátalisis heterogénea: CIEMAT*.pp. 305-329.
- Bolashikov, Z. D. y Melikov, A. K. (2009). Methods for air cleaning and protection of building occupants from airborne pathogens. *Building and Environment*, 44(7), 1378-1385.
- Bosi, C., DavinRegli, A., Charrel, R., Rocca, B., Monnet, D. y Bollet, C. (1996). *Serratia marcescens* nosocomial outbreak due to contamination of hexetidine solution. *Journal of Hospital Infection*, 33(3), 217-224.
- Bouziane, H., Latgé, J. P., Fitting, C., Mecheri, S., Lelong, M. y David, B. (2005). Comparison of the allergenic potency of spores and mycelium of *Cladosporium*. *Allergologia et Immunopathologia*, 33(3), 125-130.
- Brinker, C. J., Frye, G. C., Hurd, A. J. y Ashley, C. S. (1991). Fundamentals of sol-gel dip coating. *Thin Solid Films*, 201(1), 97-108.
- Brodie, E. L., DeSantis, T. Z., Parker, J. P. M., Zubieta, I. X., Piceno, Y. M. y Andersen, G. L. (2007). Urban aerosols harbor diverse and dynamic bacterial populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(1), 299-304.
- Brown, M. B. y Forsythe, A. B. (1974). The ANOVA and multiple comparisons for data with heterogeneous variances. *Biometrics*, 30, 719-724.
- Burger, H. (1990). Bioaerosols: prevalence and health effects in the indoor environment. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 86(5), 687-701.
- Buttner, M. P., Stetzenbach, L.D. (1991). Evaluation of four aerobiological sampling methods for the retrieval of aerosolized *Pseudomonas syringae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(4), 1268-1270.
- Cabral, J. P. S. (2010). Can we use indoor fungi as bioindicators of indoor air quality? Historical perspectives and open questions. *Science of The Total Environment*, 408(20), 4285-4295.
- Candal, R. J., Rodríguez, J., Colón, G., Gelover, S., Santos, E. V., Jiménez, A. G. y col. (2004). Materiales para fotocátalisis y electrofotocatálisis. Blesa, M. A. y Sánchez, B. (Eds.), *Eliminación de contaminantes por fotocátalisis heterogénea: CIEMAT*.pp. 189-213.
- Candal, R. J., Zeltner, W. A. y Anderson, M. A. (1999). Titanium-supported titania photoelectrodes made by sol-gel processes. *Journal of Environmental Engineering*, 125, 906-912.
- Carell, T. (1995). Sunlight-damaged DNA repaired with sunlight. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 34(22), 2491-2494.
- Cobe, H. M. (1932). Asthma due to a mold: hypersensitivity due to *Cladosporium fulvum*, Cooke. A case report. *Journal of Allergy*, 3(4), 389-391.
- Consejo de la Unión Europea (1999). Directiva 1999/30/CE del Consejo de 22 de abril de 1999 relativa a los valores límite de dióxido de azufre, dióxido de nitrógeno y óxidos de nitrógeno, partículas y plomo en el aire ambiente. *Diario oficial de las Comunidades Europeas*, 163, 41-60.

- Coronado, J. M., Sánchez, B., Portela, R. y Suárez, S. (2008). Solar photocatalysis for the elimination of trichloroethylene in the gas phase. *J.Solar Energy Eng.*, 130(1), 11-16.
- Coronado, J. M., Suárez, S., Portela, R. y Sánchez, B. (2008). Preparation of photocatalytic coatings adapted to the elimination of airborne pollutants: influence of the substrate on the degradation efficiency. *Journal of Advanced Oxidation Technologies*, 11(2), 362-369.
- Cox, C. S., Wathes, C.M. (1995). *Bioaerosols Handbook*. Boca Raton, FL, U.S.A.: Lewis Brothers (CRC Press Inc.).
- Curtis, H., Barnes, N.S. (1997). *Invitación a la biología* (5º ed.): Editorial Médica Panamericana.
- Chao, H. J., Schwartz, J., Milton, D. K., Burge, H. A. (2002). Populations and determinants of airborne fungi in large office buildings. *Environmental Health Perspectives*, 110(8), 777-782.
- Chen, F., Yang, X., Mak, H. K. C. y Chan, D. W. T. (2010). Photocatalytic oxidation for antimicrobial control in built environment: A brief literature overview. *Building and Environment*, 45(8), 1747-1754.
- Chen, F., Yang, X., Wu, Q. (2009). Photocatalytic oxidation of *Escherichia coli*, *Aspergillus niger*, and formaldehyde under different ultraviolet irradiation conditions. *Environmental Science and Technology*, 43(12), 4606-4611.
- ChuYun, H., ChingChang, L., FangChun, L., YuPei, M. y HueyJen, S. (2002). The seasonal distribution of bioaerosols in municipal landfill sites: a 3-year study. *Atmospheric Environment*, 36(27), 4385-4395.
- de Ana, G., Torres-Rodríguez, J. M., Ramírez, E. A., García, S. M. y Belmonte-Soler, J. (2006). Seasonal distribution of *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium* and *Penicillium* species isolated in homes of fungal allergic patients. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 16(6), 357-363.
- de Hoog, G. S. (1999). Ecology and evolution of black yeasts and their relatives Baarn/Delft, The Netherlands Centralbureau voor Schimmelcultures, An Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences.
- de Hoog, G. S., Guarro, J., Gené, J. y Figueras, M. J. (2000). *Atlas of clinical fungi* (2 ed.).
- Deacon, J. W. (1997a). Introduction. *Modern mycology*. Wiley-Blackwell Science(3ª), 1-28.
- Deacon, J. W. (1997b). Spores, spores dormancy and spore dispersal. *Modern mycology*. Wiley-Blackwell Science(3ª), 159-185.
- Deisseroth, A. y Dounce, A. L. (1970). Catalase: physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiol. Rev.*, 50(3), 319-375.
- Delgado, C. (2010). La lipoatrofia vuelve a la oficina. Ediciones El País, S.L.: http://elpais.com/diario/2010/08/03/catalunya/1280797640_850215.html. (05-03,2013)
- Deng, J. X., Paul, N. C., Li, M. J., Seo, E. Y., Sung, G. H. y Yu, S. H. (2011). Molecular Characterization and Morphology of Two Endophytic *Peyronellaea* Species from *Pinus koraiensis* in Korea. *Mycobiology*, 39(4), 266-271.
- Dharmage, S., Bailey, M., Raven, J., Mitakakis, T., Cheng, A., Guest, D. y col. (2001). Current indoor allergen levels of fungi and cats, but not house dust mites, influence allergy and asthma in adults with high dust mite exposure. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 164(1), 65-71.
- Dibble, L. A. y Raupp, G. B. (1990). Kinetics of the gas-solid heterogeneous photocatalytic oxidation of trichloroethylene by near UV illuminated titanium dioxide. *Catalysis Letters*, 4(4-6), 345-354.
- Dillon, H. K., Heinsohn, P. A. y Miller, J. D. (2005). *Field guide for the determination of biological contaminants in environmental samples* (2 ed.): Amer Industrial Hygiene Assn.

- Dugan, F. M., Schubert, K. y Braun, U. (2004). Check-list of *Cladosporium* names. *Schlechtendalia*, 11,, 1-119.
- Ellis, M. B. (1971). *Dematiaceous hyphomycetes*. England: C.A.B. (Commonwealth Agricultural Bureaux)
- Ellis, M. B. (1976). *More dematiaceous hyphomycetes*. England: C.A.B. (Commonwealth Agricultural Bureaux)
- Emmerich, S. J., Heinzerling, D., Choi, J. I. y Persily, A. K. (2013). Multizone modeling of strategies to reduce the spread of airborne infectious agents in healthcare facilities. *Building and Environment*, 60, 105-115.
- FEDECAI.org (c) (2001). Federación de empresas de calidad de aire de interiores: <http://www.fedecai.org/>. 22-05, 2013
- Felsenstein, J. (1995). Confidence limits on phylogenetic: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783-791.
- Fields, B. S. (2001). *Legionellae* and Legionnaires' disease. Hurst, C. J., Knudsen, G. R., McInerney, M. J. y Stetzenbach, L. D. (Eds.), *Manual of Environmental Microbiology*. Washington DC: ASM Press. 2 ed., pp. 860-870.
- Flannigan, B. (1997). Air sampling for fungi in indoor environments. *Journal of Aerosol Science*, 28(3), 381-392.
- Formenti, M., Juillet, F., Meriaudeau, P. y Teichner, S. J. (1971). Heterogeneous photocatalysis for partial oxidation of paraffins. *Chem. Techno. Nov*, 680(6).
- Fox, M. A. y Dulay, M. T. (1993). Heterogeneous photocatalysis. *Chemical Reviews*, 93(1), 341-357.
- Fraser, D. W., Tsai, T. R., Orenstein, W., Parkin, W. E., Beecham, H. J., Sharrar, R. G. y col. (1977). Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N. Engl. J. Med.*, 297(22), 1189-1197.
- Fridovich, I. (1986). Biological effects of the superoxide radical. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 247, 1-11.
- Fujishima, A., Rao, T. N. y Tryk, D. A. (2000). Titanium dioxide photocatalysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 1(1), 1-21.
- Fujishima, A. y Zhang, X. (2006). Titanium dioxide photocatalysis: present situation and future approaches. *Comptes Rendus Chimie*, 9(5-6), 750-760.
- Fujishima, A., Zhang, X. y Tryk, D. A. (2008). TiO₂ photocatalysis and related surface phenomena. *Surface Science Reports*, 63(12), 515-582.
- Games, P. A. y Howell, J. F. (1976). Pairwise multiple comparison procedures with unequal n's and/or variances: a Monte Carlo study. *Journal of Educational Statistics*, 1, 113-125.
- Gardes, M. y Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2(2), 113-118.
- Germaud, P. (2006). «*Aspergillus*» y sistema respiratorio. *EMC - Tratado de Medicina*, 10(1), 1-9.
- Glaze, W.H. (1987). Drinking-water treatment with ozone. *Environmental Science & Technology*, 21(3), 224-230.
- Glaze, W. H., Kang, J. W. y Chapin, D. H. (1987). The chemistry of water-treatment processes involving ozone, hydrogen-peroxide and ultraviolet-radiation. *Ozone-Science & Engineering*, 9(4), 335-352.
- Gorny, R. L., Reponen, T., Willeke, K., Schmechel, D., Robine, E., Boissier, M. y col. (2002). Fungal fragments as indoor air biocontaminants. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(7), 3522-3531.
- Goswami, D. Y. (1995). Engineering of solar photocatalytic detoxification and disinfection process. *Advances in Solar Energy*, 10, 165-209.

- Goswami, D. Y. (2003). Decontamination of ventilation systems using photocatalytic air cleaning technology. *Journal of Solar Energy Engineering-Transactions of the Asme*, 125(3), 359-365.
- Goswami, D. Y., Trivedi, D. M. y Block, S. S. (1997). Photocatalytic disinfection of indoor air. *Journal of Solar Energy Engineering*, 119(1), 92-96.
- Gravelle, P. C., Juillet, F., Meriaudeau, P. y Teichner, S. J. (1971). Surface reactivity of reduced titanium dioxide. *Discussions of the Faraday Society*, 52(0), 140-148.
- Greenblatt, C. L., Baum, J., Klein B.Y., Nachshon S., Koltunov V., Cano R.J. (2004). *Micrococcus luteus* survival in amber. *Microbial Ecology*, 48(1), 120-127.
- Grinberg, J. y Yarrow, D. (1970). Two new *Candida* species: *Candida chilensis* sp.n. and *Candida valdiviana* sp.n. *Antonie Van Leeuwenhoek Journal of Microbiology and Serology*, 36(1), 143-148.
- Guardino, X. S., Crump, D., Berenguer, M. J., Hoffmann, D., Ernst, L. W., M. Gracia, R. F. y col. (2001). Calidad de aire interior. *Enciclopedia de la OIT: Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. Ministerio de Trabajo e Inmigración. Spain. Vol. 2*, pp. 1-33.
- Guillard, C., Bui, T. H., Felix, C., Moules, V., Lina, B. y Lejeune, P. (2008). Microbiological disinfection of water and air by photocatalysis. *Comptes Rendus Chimie*, 11(1-2), 107-113.
- Ha, H. Y. y Anderson, M. A. (1996). Photocatalytic degradation of formic acid via metal-supported titania. *Journal of Environmental Engineering*, 122(3), 217-221.
- Haas, D., Habib, J., Galler, H., Buzina, W., Schlacher, R., Marth, E. y col. (2007). Assessment of indoor air in Austrian apartments with and without visible mold growth. *Atmospheric Environment*, 41(25), 5192-5201.
- Hargreaves, M., Parappukaran, S., Morawska, L., Hitchins, J., He, C., Gilbert, D. (2003). A pilot investigation into associations between indoor airborne fungal and non-biological particle concentrations in residential houses in Brisbane, Australia. *The Science of The Total Environment*, 312(1-3), 89-101.
- Hawksworth, D. L. (2000). The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. Paper presented at the 2nd Asia-Pacific Mycological Congress on Biodiversity and Biotechnology, Hong Kong, Peoples R China.
- Hawksworth, D. L. (2004). Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. *Studies in Mycology*(50), 9-17.
- Henningson, E. W. y Ahlberg, M. S. (1994). Evaluation of microbiological aerosol samplers: a review. *Journal of Aerosol Science*, 25(8), 1459-1492.
- Hernández, C. A. (2001). NTP 609: Agentes biológicos: equipos de muestreo (I). Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el trabajo. Ministerio de trabajo y Asuntos sociales. España, 1-11.
- Hinds, W. C. (1999). Bioaerosols. *Aerosol technology: properties, behaviour and measurement of airborne particles*. United States, John Wiley & Sons, New York, 394-401.
- Hoffmann, M. R., Martin, S. T., Choi, W. Y. y Bahnemann, D. W. (1995). Environmental applications of semiconductor photocatalysis. *Chemical Reviews*, 95(1), 69-96.
- Hollands, K. G. T., Iynkaran, K., Ford, C. y Platzer, W. J. (1992). Manufacture, solar transmission, and heat transfer characteristics of large-celled honeycomb transparent insulation. *Solar Energy*, 49(5), 381-385.
- Huang, S. W. (2000). The risk of sinusitis in children with allergic rhinitis. *Allergy and Asthma Proceedings*, 21(5), 85-88.
- Humphreys, H. (2004). Positive-pressure isolation and the prevention of invasive aspergillosis. What is the evidence? *Journal of Hospital Infection*, 56(2), 93-100.

- IARC (2002). Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans Lyon (France): IARC Press and WHO Marketing and Dissemination (MDI). Vol. 82, pp. 1-590.
- IARC (2010). Carbon Black, titanium dioxide, and talc. . IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans IARC and WHO press. Vol. 93, pp. 193-276.
- ISO 14698-1 (2003). Cleanrooms and associated controlled environments. Biocontamination control, Part 1: General principles and methods.
- ISO 16000-19 (2012). Indoor Air. Part 19: Sampling strategy for moulds.
- Izquierdo, R. M. (2001). La reacción en cadena de la polimerasa. Ingeniería genética y transferencia génica. Madrid, : Ediciones Pirámide (Grupo Anaya, S.A.). pp. 87-102.
- Jacoby, W. A., Maness, P. C., Wolfrum, E. J. y Blake, D. M. (1998). Mineralization of bacterial cell mass on a photocatalytic surface in air. Environmental Science and Technology, 32:17, 2650-2654.
- Jensen, A. B. y Schafer, M. P. (1998). Sampling and characterization of bioaerosols. NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health). Manual of Analytical Methods. NIOSH/DPSE, 1-112.
- Jernigan, D. B., Raghunathan, P. L., Bell, B. P., Brechner, R., Bresnitz, E. A., Butler, J. C. y col. (2002). Investigation of bioterrorism-related anthrax, United States, 2001: epidemiologic findings. Emerging Infectious Diseases, 8(10), 1019-1028.
- Jones, A. P. (1999). Indoor air quality and health. Atmospheric Environment, 33(28), 4535-4564.
- Josset, S., Taranto, J., Keller, N., Keller, V. y Lett, M. C. (2010). Photocatalytic treatment of bioaerosols: impact of the reactor design. Environmental Science & Technology, 44(7), 2605-2611.
- Josset, S., Taranto, J., Keller, N., Keller, V., Lett, M. C., Ledoux, M. J. y col. (2007). UV-A photocatalytic treatment of high flow rate air contaminated with *Legionella pneumophila*. Catalysis Today, 129(1-2), 215-222.
- Kawai, T. y Sakata, T. (1979). Hydrogen evolution from water using solid carbon and light energy. Nature, 282, 283-284.
- Kharseeva, G. G., Alutina, E. L. y Vasil'eva, G. I. (2012). Macrophage apoptosis as a mechanism of pathogenic effect of diphtheria infectious agent. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, i immunobiologii(5), 63-66.
- Kimura, M. (1981). Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 454-458.
- Klich, M. A. (2002). Identification of common *Aspergillus* species. Utrecht, The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Koch, A. L. (1996). What size should a bacterium be? A question of scale. Annual Review of Microbiology, 50, 317-348.
- Kowalski, W. J., Bahnfleth, W. P., Striebig, B. A. y Whittam, T. S. (2003). Demonstration of a hermetic airborne ozone disinfection system: studies on *E. coli*. AIHA J., 64, 222-227.
- Kowalski, W. J., Bahnfleth, W. P. y Whittam, T. S. (1999). Filtration of airborne microorganisms: modeling and prediction. ASHRAE Transactions: Research, 4273, 4-17.
- Kowalski, W. J., Bahnfleth, W. P., Witham, D. L., Severin, B. F. y Whittam, T. S. (2000). Mathematical modeling of ultraviolet germicidal irradiation for air disinfection. Quantitative Microbiology, 2(3), 249-270.
- Kruskal, W. H. y Wallis, W. A. (1952). Use of ranks on one-criterion variance analysis Journal of the American Statistical Association, 47, 583-621.
- Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. Stackebrandt, E. y Goodfellow, M. (Eds.), Nucleic acid techniques in bacterial systematics. London (England): John Wiley & Sons, Ltd. pp. 115-175.

- Larson, R. A. y Berenbaum, M. R. (1988). Environmental phototoxicity. *Environmental Science & Technology*, 22(4), 354-360.
- Lee, T., Grinshpun, S. A., Martuzevicius, D., Adhikari, A., Crawford, C. M., Luo, J. y col. (2006). Relationship between indoor and outdoor bioaerosols collected with a button inhalable aerosol sampler in urban homes. *Indoor Air*, 16(1), 37-47.
- Legrini, O., Oliveros, E. y Braun, A. M. (1993). Photochemical processes for water treatment. *Chemical Reviews*, 93(2), 671-698.
- Levene, H. (1960). Robust tests for the equality of variances. Olkin, J. (Ed.), *Contributions to probability and statistics*. Palo Alto, CA: Stanford University Press.
- Lewis, F. A. (1995). Regulating indoor microbes, the OSHA proposed rule on IAQ, a focus on microbial contamination. Johanning, E. y Yang, C. (Eds.), *Fungi and bacteria in indoor environments, health effects, detection and remediation*. Albany, NY: Eastern New York Occupational Health Program. pp. 5-9.
- Lin, C. Y. y Li, C. S. (2003). Effectiveness of titanium dioxide photocatalyst filters for controlling bioaerosols. *Aerosol Science and Technology*, 37(2), 162-170.
- Linsebigler, A. L., Guangquan, L. y Yates, J. T. (1995). Photocatalysis on TiO₂ surfaces: principles, mechanisms, and selected results. *Chem.Rev.*, 95, 735-758.
- Lonnen, J., Kilvington, S., Kehoe, S. C., Al-Touati, F., McGuigan, K. G. (2005). Solar and photocatalytic disinfection of protozoan, fungal and bacterial microbes in drinking water. *Water Research*, 39(5), 883.
- lookfordiagnosis.com (2009). Estructura 16S ARNr:
http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Arn+Ribosomal+16S&lang=2.
 (28-05, 2013)
- Macher, J. M. (1989). Positive-hole correction of multiple-jet impactors for collecting viable microorganisms. *American Industrial Hygiene Association Journal*, 50(11), 561 - 568.
- Madigan, M. T., Martinko, J. y Parker, J. (2009). 14. Evolución y sistemática microbiana. Brock. *Biología de los microorganismos*. San Francisco, Calif.: Addison-Wesley. 12 ed., pp. 405-439.
- Madigan, M. T., Martinko, J. y Parker, J. (2009). Brock biology of microorganisms (12th ed. ed.). San Francisco, Calif. : Pearson/Benjamin Cummings.
- Mainelis, G., Adhikari, A., Willeke, K., Lee, S. A., Reponen, T. y Grinshpun, S. A. (2002a). Collection of airborne microorganisms by a new electrostatic precipitator. *Journal of Aerosol Science*, 33(10), 1417-1432.
- Mainelis, G., Gorny, R. L., Reponen, T., Trunov, M., Grinshpun, S. A., Baron, P. y col. (2002b). Effect of electrical charges and fields on injury and viability of airborne bacteria. *Biotechnology and Bioengineering*, 79(2), 229-241.
- Malato, R. S., Julian, B. G. y Claudio A., E. G. (2004). Photocatalysis. *Solar Energy*, 77(5), 443-444.
- Mandal, J., V, Ganesh, Emelda, Jennifer, S, Mahadevan, Parija, Subhash Chandra (2012). The recent trends of shigellosis: a JIPMER perspective. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*, 6(9), 1474-1477.
- Maness, P. C., Smolinski, S., Blake, D. M., Huang, Z., Wolfrum, E. J. y Jacoby, W. A. (1999). Bactericidal activity of photocatalytic TiO₂ reaction: toward an understanding of its killing mechanism. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(9), 4094-4098.
- Mann, H. B. y Whitney, D. R. (1947). On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other *Annals of Mathematical Statistics*, 18, 50-60.
- Martí, S. M. C. y Obiols, Q. J. (1991). NTP 288: Síndrome del edificio enfermo: enfermedades relacionadas y papel de los bioaerosoles. 1-6.
- Martínez, K., Rao, C. y Burton, N. (2004). Exposure assessment and analysis for biological agents. *Grana*, 43 (4), 193-208.

- Matsunaga, T., Tomoda, R., Nakajima, T., Nakamura, N. y Komine, T. (1988). Continuous-sterilization system that uses photoconductor powders. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(6), 1330-1333.
- Matsunaga, T., Tomoda, R., Nakajima, T. y Wake, H. (1985). Photoelectrochemical sterilization of microbial cells by semiconductor powders. *FEMS Microbiology Letters*, 29(1-2), 211-214.
- Matthews, R. W. (1987). Photooxidation of organic impurities in water using thin films of titanium dioxide. *J. Phys. Chem.*, 91(12), 3328-3333.
- Mehta, S. K., Mishra, S. K., Pierson, D. L. (1996). Evaluation of three portable samplers for monitoring airborne fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(5), 1835-1838.
- Meklin, T., Reponen, T., McKinstry, C., Cho, S. H., Grinshpun, S. A., Nevalainen, A. y col. (2007). Comparison of mold concentrations quantified by MSQPCR in indoor and outdoor air sampled simultaneously. *Science of The Total Environment*, 382(1), 130-134.
- Mergaert, J., Cnockaert, M. C. y Swings, J. (2002). *Phyllobacterium myrsinacearum* (subjective synonym *Phyllobacterium rubiacearum*) emend. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 1821-1823.
- Miranda-García, N., Suárez, S., Sánchez, B., Coronado, J. M., Malato, S. y Maldonado, M. I. (2011). Photocatalytic degradation of emerging contaminants in municipal wastewater treatment plant effluents using immobilized TiO₂ in a solar pilot plant. *Applied Catalysis B: Environmental*, 103(3-4), 294-301.
- Molina, C., Pickering, C. A. C., Valbjorn, O. y De Bortoli, M. (1989). Sick building syndrome. A practical guide (Report N°4). Indoor Air Quality and its impact on man. Commission of the European Communities. Directorate General for Science (Ed.), Cost project 613. Environment and Quality of life.
- Moore, E. R. B., Arnscheidt, A., Krüger, A., Strömpl, C. y Mau, M. (1999). Simplified protocols for the preparation of genomic DNA from bacterial cultures. Akkermans, A. D. L., Van Elsas, J. D. y de Bruijn, F. J. (Eds.), *Molecular microbial ecology manual*: Dordrecht: Kluwer Academic. Vol. 1, pp. 1-15.
- Mullen, J., Hodgson, M. J., DeGraff, C. A. y Godar, T. (1998). Case-control study of idiopathic pulmonary fibrosis and environmental exposures. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 40(4), 363-367.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. y Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposium in Quantitative Biology*, 51, 263-273.
- Muñoz-Vicente, M., Hernández-Alonso, M. D., Suárez, S., Sánchez-Muñoz, M. y Sánchez, B. (2012). Indoor air bacteria and VOCs elimination using Al/one -dimensional TiO₂ nanostructures as photocatalysts for air conditioning systems. Paper presented at the SPEA 7 (7th European meeting on solar chemistry and photocatalysis: Environmental applications) Oporto (Portugal).
- Muyzer, G., de Waal, E. C. y Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 695-700.
- Muyzer, G., Hottenträger, S., Teske, A. y Wawer, C. (1996). Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA- A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. Akkermans, A. D. L., Van Elsas, J. D. y de Bruijn, F. J. (Eds.), *Molecular Microbial Ecology Manual*. Dordrecht (Netherlands): Kluwer Academic Publishers. pp. 3.4.4.1-3.4.4.22.

- Myers, R. M., Maniatis, T. y Lerman, L. S. (1987). Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. Ray, W. (Ed.), *Methods in Enzymology*: Academic Press. Vol. 155, pp. 501-527.
- NCBI (2013). Taxonomy-fungi:
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/?term=fungi\[organism\]%20AND%20species\[rank\]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/?term=fungi[organism]%20AND%20species[rank]). (27-05, 2013)
- Olenchock, S. A. (2001). Airborne endotoxin. Hurst, C. J., Crawford, R. L., Knudsen, G. R., McInerney, M. J., y col. (Eds.), *Manual of Environmental Microbiology*. Washinton D.C.: ASM Press. pp. 853-859.
- OSHA (2011). Indoor air quality in commercial and institutional buildings. Occupational safety and health administration (OSHA), U.S. Department of Labor (3430-04).
- OSMAN (2001). Calidad del aire interior. Observatorio de Salud y Medio Ambiente de Andalucía (OSMAN), Junta de Andalucía, Unión Europea, 1-132.
- Paschoalino, M. P. y Jardim, W. F. (2008). Indoor air disinfection using a polyester supported TiO₂ photo-reactor. *Indoor Air*, 18(6), 473-479.
- Pastuszka, J. S., Kyaw Tha Paw, U., Lis, D. O., Wlazlo, A. y Ulfig, K. (2000). Bacterial and fungal aerosol in indoor environment in Upper Silesia, Poland. *Atmospheric Environment*, 34(22), 3833-3842.
- Patel, A. M., Ryu, J. H. y Reed, C. E. (2001). Hypersensitivity pneumonitis: current concepts and future questions. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 108(5), 661-670.
- Paz, Y. (2010). Application of TiO₂ photocatalysis for air treatment: patents' overview. *Applied Catalysis B: Environmental*, 99(3-4), 448-460.
- Pearson, K. (1896). Mathematical contributions to the Theory of Evolution. III. Regression, heredity and panmixia. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 187, 253-318.
- Plaza, V., Serrano, J., Picado, C., Cosano, J., Ancochea, J., de Diego, A. y col. (2003). Características clínicas de las crisis de asma de riesgo vital en los pacientes sensibilizados a *Alternaria alternata*. *Medicina Clínica*, 121(19), 721-724.
- Portela, R. (2009). Eliminación fotocatalítica de H₂S en aire mediante TiO₂ soportado sobre sustratos transparentes en el UV-A. Universidad de Santiago de Compostela, España.
- Portela, R., Sánchez, B. y Coronado, J. M. (2007a). Photocatalytic oxidation of H₂S on TiO₂ and TiO₂-ZrO₂ thin films. *Journal of Advanced Oxidation Technologies*, 10(2), 375-380.
- Portela, R., Sánchez, B., Coronado, J. M., Candal, R. J. y Suárez, S. (2007b). Selection of TiO₂-support: UV-transparent alternatives and long-term use limitations for H₂S removal. *Catalysis Today*, 129(1-2), 223-230.
- Pozzo, R. L., Baltanás, M. A. y Cassano, A. E. (1997). Supported titanium oxide as photocatalyst in water decontamination: state of the art. *Catalysis Today*, 39, 219-231.
- Rajasekar, A. y Balasubramanian, R. (2011). Assessment of airborne bacteria and fungi in food courts. *Building and Environment*, 46(10), 2081-2087.
- Ramírez, C. (1982). *Manual and atlas of the Penicillia*. Amsterdam, Holanda: Elsevier Biomedical Press.
- Raper, K. B., Thom, C. y Fennel, D. I. (1949). *A Manual of the Penicillia*. The Williams and Wilkins Company.
- Razatos, A., Ong, Y. L., Sharma, M. M. y Georgiou, G. (1998). Molecular determinants of bacterial adhesion monitored by atomic force microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(19), 11059-11064.

- Rehner, S. A. y Buckley, E. (2005). A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia*, 97(1), 84-98.
- Reponen, T., Grinshpun, S. A., Conwell, K. L., Wiest, J. y Anderson, W. J. (2001). Aerodynamic versus physical size of spores: measurement and implication for respiratory deposition. *Grana*, 40(3), 119-125.
- Reponen, T. A., Gizenko, S. V., Grinshpun, S. A., Willeke, K. y Cole, E. C. (1998). Characteristics of airborne actinomycete spores. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10), 3807-3812.
- Rosas I., S. E., Martínez L., Eslava C., Cravioto A. (2007). Bacterias en la atmósfera. Publicaciones del Instituto Nacional de Ecología. Journal. <http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/libros/440/cap1.html>
- Rylander, R. y Lin, R. H. (2000). (1-3)-B-d-glucan- relationship to indoor air-related symptoms, allergy and asthma. *Toxicology*, 152(1-3), 47-52.
- Sáenz, L. C. y Gutiérrez, B. M. (2003). Esporas atmosféricas en la Comunidad de Madrid. Documentos Técnicos de Salud Pública. Instituto de Salud Pública, Comunidad de Madrid, Consejería de Sanidad. , 83, 1-84.
- Saito, T., Iwase, T., Horie, J., Morioka, T. (1992). Mode of photocatalytic bactericidal action of powdered semiconductor TiO₂ on mutans *streptococci*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 14(4), 379.
- Saitou, N. y Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406-425.
- Saldanha, R., Manno, M., Saleh, M., Ewaze, J. O., Scott, J. A. (2008). The influence of sampling duration on recovery of culturable fungi using the Andersen N6 and RCS bioaerosol samplers. *Indoor Air*, 18(6), 464-472.
- Salonen, H., Lappalainen, S., Lindroos, O., Harju, R. y Reijula, K. (2007). Fungi and bacteria in mould-damaged and non-damaged office environments in a subarctic climate. *Atmospheric Environment*, 41(32), 6797-6807.
- Samson, R. A. y Frisvad, J. C. (2004a). *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes and mycotoxins and other extrolites. Utrecht, The Netherlands: Centralalbureau Voor Schimmelcultures.
- Samson, R. A., Hoekstra, E. S. y Frisvad, J. C. (2004b). Introduction to food and airborne fungi (7 ed.). Utrecht, The Netherlands: Centralalbureau Voor Schimmelcultures.
- Samson, R. A. y Varga, J. (2007). *Aspergillus* systematics in the genomic era Utrecht, The Netherlands: Centralalbureau Voor Schimmelcultures, Fungal Biodiversity Centre.
- Sánchez-Ballesteros, V. J. (2001). Filogenia y caracterización molecular de hongos ascomicetos de la Familia *Xylariaceae*. Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, departamento de Biología Molecular, Madrid.
- Sánchez-Muñoz, M. y Muñoz-Vicente, M. (2011). Indoor air photocatalytic treatment. Blanco, J. (Ed.), Decontamination and disinfection of water and air by solar advanced oxidation processes: CIEMAT.pp. 147-164.
- Sánchez-Muñoz, M., Muñoz-Vicente, M., Cobas, G., Portela, R., Amils, R. y Sánchez, B. (2012). Comparison of three high-flow single-stage impaction-based air samplers for bacteria quantification: DUO SAS SUPER 360, SAMPL' AIR and SPIN AIR. *Analytical Methods*, 4(2), 399-405.
- Sánchez, B., Cardona, A. I., Peral, J. y Litter, M. I. (2004). Purificación de gases por fotocátalisis heterogénea: estado del arte. Eliminación de contaminantes por fotocátalisis heterogénea: CIEMAT.pp. 35-66.
- Sánchez, B., Coronado, J. M., Candal, R., Portela, R., Tejedor, I., Anderson, M. A. y col. (2006). Preparation of TiO₂ coatings on PET monoliths for the photocatalytic elimination of

- trichloroethylene in the gas phase. *Applied Catalysis B: Environmental*, 66(3-4), 295-301.
- Sánchez, B., Portela, R., Suárez, S. y Coronado, J. M. (2009). Fotorreactor tubular para fotocatalizadores soportados (Tubular photoreactor for supported photocatalysts) PCT/ES2010/070799 (Spain:P200931134).
- Sánchez, B., Sánchez-Muñoz, M., Muñoz-Vicente, M., Cobas, G., Portela, R., Suárez, S. y col. (2012). Photocatalytic elimination of indoor air biological and chemical pollution in realistic conditions. *Chemosphere*, 87(6), 625-630.
- Sen, B. y Asan, A. (2009). Fungal flora in indoor and outdoor air of different residential houses in Tekirdag City (Turkey): seasonal distribution and relationship with climatic factors. *Environmental Monitoring and Assessment*, 151(1-4), 209-219.
- Serrano, C., Torrego, A., Loosli, A., Valero, A. y Picado, C. (2010). Neumonitis por hipersensibilidad tras exposición a *Candida* spp. *Archivos de Bronconeumología*, 46(05), 275-277.
- Seuri, M., Husman, K., Kinnunen, H., Reiman, M., Kreuz, R., Kuronen, P. y col. (2000). An outbreak of respiratory diseases among workers at a water-damaged building - A case report *Indoor Air-International Journal of Indoor Air Quality and Climate*, 10(3), 138-145.
- Shapiro, S. S. y Wilk, M. B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 52, 591-611.
- Shelton, B. G., Kirkland, K. H., Flanders, W. D. y Morris, G. K. (2002). Profiles of airborne fungi in buildings and outdoor environments in the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1743-1753.
- Sichel, C., Tello, J., de Cara, M., Fernández-Ibáñez, P. (2007). Effect of UV solar intensity and dose on the photocatalytic disinfection of bacteria and fungi. *Catalysis Today*, 129(1-2), 152-160.
- Simmons, E. G. (2007). *Alternaria*, an identification manual. Utrecht, Netherlands: CBS Fungal Biodiversity Centre.
- Spatafora, J. W. (2005). Assembling the fungal tree of life (AFTOL). *Mycological Research*, 109(7), 755-756.
- Spearman, C. (1904). The proof and measurement of association between two things. *American Journal of Psychology*, 15, 72-101.
- Spengler, J. D. y Sexton, K. (1983). Indoor air pollution: a public health perspective. *Science, New Series*, 221(4605), 9-17.
- Stahl, D. A. y Amann, R. (1991). Development and application of nucleic acid probes. Stackebrandt, E. y Goodfellow, M. (Eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. Vol. 8, pp. 205-248.
- Stetzenbach, L. D. (2001). Introduction to Aerobiology. Hurst, C. J., Knudsen, G. R., McInerney, M. J. y Stetzenbach, L. D. (Eds.), *Manual of Environmental Microbiology*. Washington DC: ASM Press. pp. 801-859.
- Storey, E., Dangman, K. H., Schenck, P., DeBernardo, R. L., Yang, C. S., Bracker, A. y col. (2004). Guidance for clinicians on the recognition and management of health effects related to mold exposure and moisture indoors. Center for Indoor Environments and Health. University of Connecticut Health Center.
- Student (1908). The probable error of a mean *Biometrika*(6), 1-25.
- Suárez, S., Coronado, J. M., Portela, R., Martín, J. C., Yates, M., Ávila, P. y col. (2008). On the preparation of TiO₂-sepiolite hybrid materials for the photocatalytic degradation of TCE: influence of TiO₂ distribution in the mineralization. *Environ. Sci. Technol.*, 42(16), 5892-5896.

- Sunada, K., Kikuchi, Y., Hashimoto, K. y Fujishima, A. (1998). Bactericidal and detoxification effects of TiO₂ thin film photocatalysts. *Environmental Science & Technology*, 32(5), 726-728.
- Sunada, K., Watanabe, T. y Hashimoto, K. (2003). Studies on photokilling of bacteria on TiO₂ thin film. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 156(1-3), 227-233.
- Teichner, S. J. (2008). The origins of photocatalysis. *Journal of Porous Materials*, 15(3), 311-314.
- Terao, Y. (2012). The virulence factors and pathogenic mechanisms of *Streptococcus pyogenes*. *Journal of Oral Biosciences*, 54(2), 96-100.
- Thorne, P. S., Kiekhaefer, M. S., Whitten, P. y Donham, K. J. (1992). Comparison of bioaerosol sampling methods in barns housing swine. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(8), 2543-2551.
- Tortora, G. J., Funke, B. R. y Case, C. L. (2007). Procariontes: dominios Bacteria y Archaea. *Introducción a la Microbiología: Editorial Médica Panamericana*. pp. 312-339.
- U.S. EPA (1990a). Reducing risk: setting priorities and strategies for environmental protection. United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA), Office of Air and Radiation, 1-26.
- U.S. EPA (1990b). Nonoccupational pesticide exposure study. Final report. U.S.EPA, Atmospheric Research and Exposure Assessment laboratory. Office of Research and Development.
- U.S. EPA (1991). Indoor air facts N°4. Sick building syndrome U.S.EPA, Air and Radiation (6609J), Research and Development (MD-56).
- U.S. EPA (2001). Healthy buildings, healthy people: A vision for the 21st century U.S. EPA, Office of Air and Radiation, 402-K-01-003.
- U.S. EPA (2009). Residential air cleaners. A summary of available information. 2° Edition. U.S. EPA., Indoor Air Quality (IAQ), EPA 402-F-09-002.
- UNE 77260-3 (2004). Aire de interiores. Parte 3: Determinación de formaldehído y otros compuestos carbonílicos. Método de muestreo activo. AENOR (Asociación Española de Normalización y Certificación). Comité técnico AEN/CTN 77. Medio Ambiente, 1-30.
- UNE 100012 (2005). Higienización de sistemas de climatización. AENOR. Comité técnico AEN/CTN 100. Climatización.
- UNE 171330-1 (2008). Calidad ambiental en interiores. Parte 1: Diagnóstico de calidad ambiental interior. AENOR. Comité técnico AEN/CTN 171. Calidad ambiental en interiores.
- UNE 171330-2 (2009a). Calidad ambiental en interiores. Parte 2: Procedimientos de inspección de calidad ambiental interior. AENOR (Asociación Española de Normalización y Certificación). Este informe ha sido elaborado por el comité técnico AEN/CTN 171 Calidad ambiental en interiores, cuya secretaría representa AENOR. .
- UNE 171330-2 (2009b). Indoor Air Quality. Part 2: Indoor air quality inspection procedures. AENOR. AEN/CTN 171. Indoor Air Quality.
- UNE 171330-3 (2010). Calidad ambiental en interiores. Parte 3: Sistema de gestión de los ambientes interiores. AENOR. Comité técnico AEN/CTN 171. Calidad ambiental en interiores.
- Vohra, A., Goswami, D. Y., Deshpande, D. A. y Block, S. S. (2005). Enhanced photocatalytic inactivation of bacterial spores on surfaces in air. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 32(8), 364-370.
- Vohra, A., Goswami, D. Y., Deshpande, D. A. y Block, S. S. (2006). Enhanced photocatalytic disinfection of indoor air. *Applied Catalysis B: Environmental*, 64(1-2), 57-65.

- Wan, G. H. y Li, C. S. (1998). Indoor endotoxin and glucan in association with sick building syndrome. *Journal of Aerosol Science*, 29(Supplement 2), S1309-S1310.
- Ward, D. M., Weller, R., Bateson, M.M., (1990). 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature*, 345(6270), 63-65.
- Welch, B. L. (1951). On the comparison of several means values: An alternative approach. *Biometrika*, 38, 330-336.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. y Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. y White, T. J. (Eds.), *PCR Protocols: a guide to methods and applications*: Academic Press, Inc. pp. 315-322.
- Whittaker, R. H. (1969). New concepts of kingdoms or organisms. Evolutionary relations are better represented by new classifications than by the traditional two kingdoms *Science*, 163, 150-160.
- WHO (1983). Indoor air pollutants: exposure and health effects. World Health Organization (WHO), Regional office for Europe, Euro Reports and Studies 78, 1-42.
- WHO (1998). Man-made mineral fibres and radon. World Health Organization (WHO), International Agency for Research of Cancer, IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 43, 1-9.
- WHO (2000). The right to healthy indoor air. World Health Organization Europe (WHO), Report on a WHO meeting, European Health 21, targets 10,13, Bilthoven, The Netherlands, 1-14.
- WHO (2002). The world health report. Reducing risks, promoting healthy life. WHO, 1-248.
- WHO (2003). Health aspects of air pollution with particulate matter, ozone and nitrogen dioxide. WHO. Report on a WHO working group. WHO regional office for Europe, 1-94.
- WHO (2005). Effects of air pollution on children's health and development. A review of the evidence. WHO, special programme on health and environment, European Centre for Environment and Health, 1-185.
- WHO (2007). Smokeless tobacco and some tobacco-specific n-nitrosamines. WHO, IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 89, 1-626.
- WHO (2009). Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks. World Health Organization (WHO). Department of Health Statistics and Informatics in the Information, Evidence and Research Cluster of the World Health Organization (WHO). (1-62), 62.
- WHO (2010). WHO guidelines for indoor air quality. Selected pollutants. WHO Regional Office for Europe, 1-454.
- Woese, C. R. (1994). There must be a prokaryote somewhere: Microbiology's search for itself. *Microbiological Reviews*, 58(1), 1-9.
- Wolfgang, L., Gerhard, M. y Cornelius, G. F. (1993). Transfer of *Thiosphaera pantotropha* to *Paracoccus denitrificans*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 43(2), 363-367.
- Wolfrum, E. J., Huang, J., Blake, D. M., Maness, P.-C., Huang, Z., Fiest, J. y col. (2002). Photocatalytic oxidation of bacteria, bacterial and fungal spores, and model biofilm components to carbon dioxide on titanium dioxide-coated surfaces. *Environmental Science & Technology*, 36(15), 3412-3419.
- Wu, F., Jacobs, D., Mitchell, C., Miller, D. y Karol, M. H. (2007). Improving indoor environmental quality for public health: impediments and policy recommendations. *Environmental Health Perspectives*, 115(6), 953-964.
- Xu, P., Peccia, J., Fabian, P., Martyny, J. W., Fennelly, K. P., Hernandez, M. y col. (2003). Efficacy of ultraviolet germicidal irradiation of upper-room air in inactivating

- airborne bacterial spores and mycobacteria in full-scale studies. *Atmospheric Environment*, 37(3), 405-419.
- Yamazaki-Nishida, S., Nagano, J. K., Phillips, L. A., Cervera-March, S. y Anderson, M. A. (1993). Photocatalytic degradation of trichloroethylene in the gas phase using titanium dioxide pellets. *J.Photochem.Photobiol.A: Chem.*, 70, 95-99.
- Yang, C. S. y Heinsohn, P. (2007). Sampling and analysis of indoor microorganisms. Hoboken, New Jersey: Wiley - Interscience. John Wiley and Sons, inc.
- Yang, C. S. y Johanning, E. (2001). Airborne fungi and micotoxins. Hurst, C. J., Knudsen, G. R., McInerney, M. J. y Stetzenbach, L. D. (Eds.), *Manual of environmental microbiology*. Washinton D.C.: ASM Press.pp. 839-852.
- Yao, M. S. y Mainelis, G. (2006a). Effect of physical and biological parameters on enumeration of bioaerosols by portable microbial impactors. *Journal of Aerosol Science*, 37(11), 1467-1483.
- Yao, M. S. y Mainelis, G. (2006b). Utilization of natural electrical charges on airborne microorganisms for their collection by electrostatic means. *Journal of Aerosol Science*, 37(4), 513-527.
- Yeung, K. L., Leung, W. K., Yao, N. y Cao, S. (2009). Reactivity and antimicrobial properties of nanostructured titanium dioxide. *Catalysis Today*, 143(3-4), 218-224.
- Yocum, M. W., Saltzman, A. R., Strong, D. M., Donaldson, J. C., Ward Jr, G. W., Walsh, F. M. y col. (1976). Extrinsic allergic alveolitis after *aspergillus fumigatus* inhalation: Evidence of a type IV immunologic pathogenesis. *The American Journal of Medicine*, 61(6), 939-945.
- Zabiegala, B., Kot-Wasik, A., Urbanowicz, M. y Namiesnik, J. (2010). Passive sampling as a tool for obtaining reliable analytical information in environmental quality monitoring. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(1), 273-296.
- Zhang, Y., Mo, J., Li, Y., Sundell, J., Wargocki, P., Zhang, J. y col. (2011). Can commonly-used fan-driven air cleaning technologies improve indoor air quality? A literature review. *Atmospheric Environment*, 45(26), 4329-4343.
- Zhen, S., Li, K., Yin, L., Yao, M., Zhang, H., Chen, L. y col. (2009). A comparison of the efficiencies of a portable BioStage impactor and a Reuter centrifugal sampler (RCS) High Flow for measuring airborne bacteria and fungi concentrations. *Journal of Aerosol Science*, 40(6), 503-513.

ANEXO I

GÉNEROS Y ESPECIES DE HONGOS IDENTIFICADOS EN ESTA TESIS

1. *Alternaria*

Alternaria es un género con representantes allí donde haya materia vegetal. Las especies más conocidas son parásitos invasivos y patógenos de plantas en todo el mundo. Otras, participan en el reciclaje natural de los desechos orgánicos y muchas son perjudiciales para la producción y distribución de comida y plantas hortícolas. Algunas especies son alergénicas y otras producen metabolitos secundarios tóxicos para animales. *Alternaria alternata* ((Fr.) Keissler) produce metabolitos tóxicos como altenuene, alternariol monomethylether y tentoxin (Samson y col., 2004b). *Alternaria oregonensis*, *Alternaria infectoria* y *Alternaria ethzedia* forman junto con más de 30 taxones anamorfos el grupo de especies *Alternaria infectoria*. Clasificadas dentro del grupo Deuteromycota, algunas de ellas tienen un estado teleomorfo *Lewia*. Este grupo tiene características morfológicas comunes, como el patrón de esporulación tridimensional y la producción de conidios pequeños (hasta 70µm de longitud) con conidióforos secundarios largos (hasta 120µm de longitud). También producen metabolitos que no se encuentran en otros grupos de especies (Samson y col., 2004b; Simmons, 2007; Andersen y col., 2009). Los teleomorfos de *Alternaria* se clasifican dentro del filo Ascomycota.



Figura 1-6: *Alternaria alternata*, 1y2: colonia de *A. alternata* de una semana en AEM; 7. *Lewia infectoria*.

2. *Aspergillus*

El género *Aspergillus* está ampliamente distribuido en la tierra y es contaminante de múltiples sustratos, siendo algunas especies patógenas para animales y humanos o alergénicas. Afectan sobre todo a pacientes inmunodeprimidos y es uno de los hongos que son detectados con mayor frecuencia en ambientes interiores. Entre las especies aisladas en muestreos de aire interior y exterior se encuentran con frecuencia *A. niger* y *A. terreus*, identificadas en este estudio, y responsables junto a *A. fumigatus* y *A. flavus* de algunos de los casos de aspergilosis. Producen gran variedad de micotoxinas, como las aflatoxinas, que dañan al hígado y pueden encontrarse en nueces, cacahuètes o maíz. Además, producen gran variedad de metabolitos que han sido explotados como compuestos medicinales conjuntamente con enzimas y ácidos (Klich, 2002). Por otro lado, también degradan productos de la agricultura antes y después de la cosecha y estropean alimentos. Clasificados dentro del grupo artificial Deuteromycota, el género contiene más de 180 especies reconocidas y muchas de ellas tienen un teleomorfo Ascomycota (Samson y col., 2007). *Emericella nidulans*, identificado en este estudio es el teleomorfo de *Aspergillus niger*.

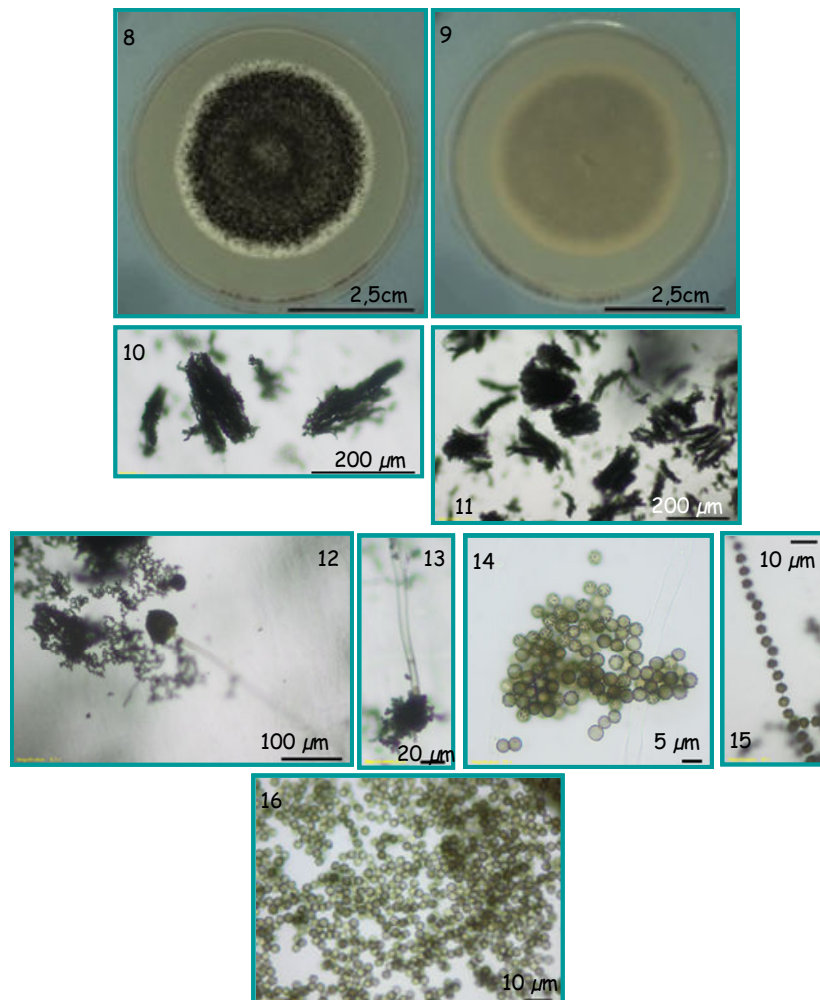


Figura 8-16: *Aspergillus niger*; 8y9: colonia a los 7 días en AEM; 10-13: conidióforos y conidios; 14-16: conidios.

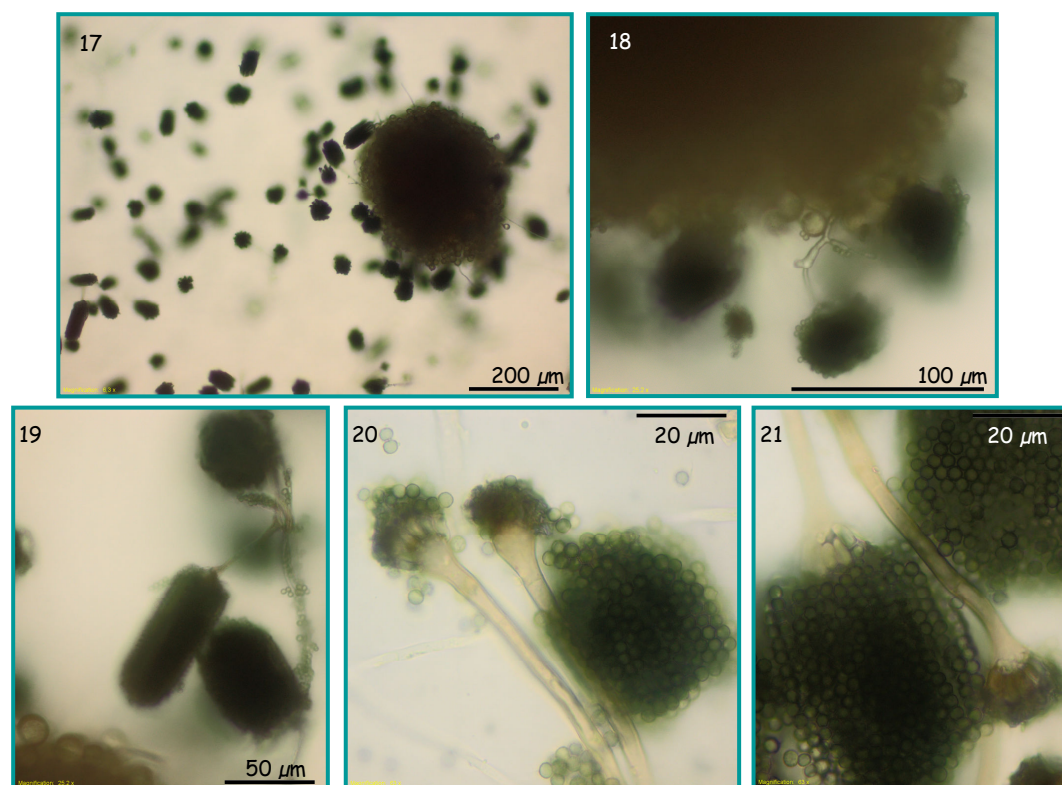


Figura 17-21: *Emericella nidulans*; 17 y 18: cleistotecios globosos rodeados de células de Hülle y conidióforos; 19-21: conidióforos y conidios.

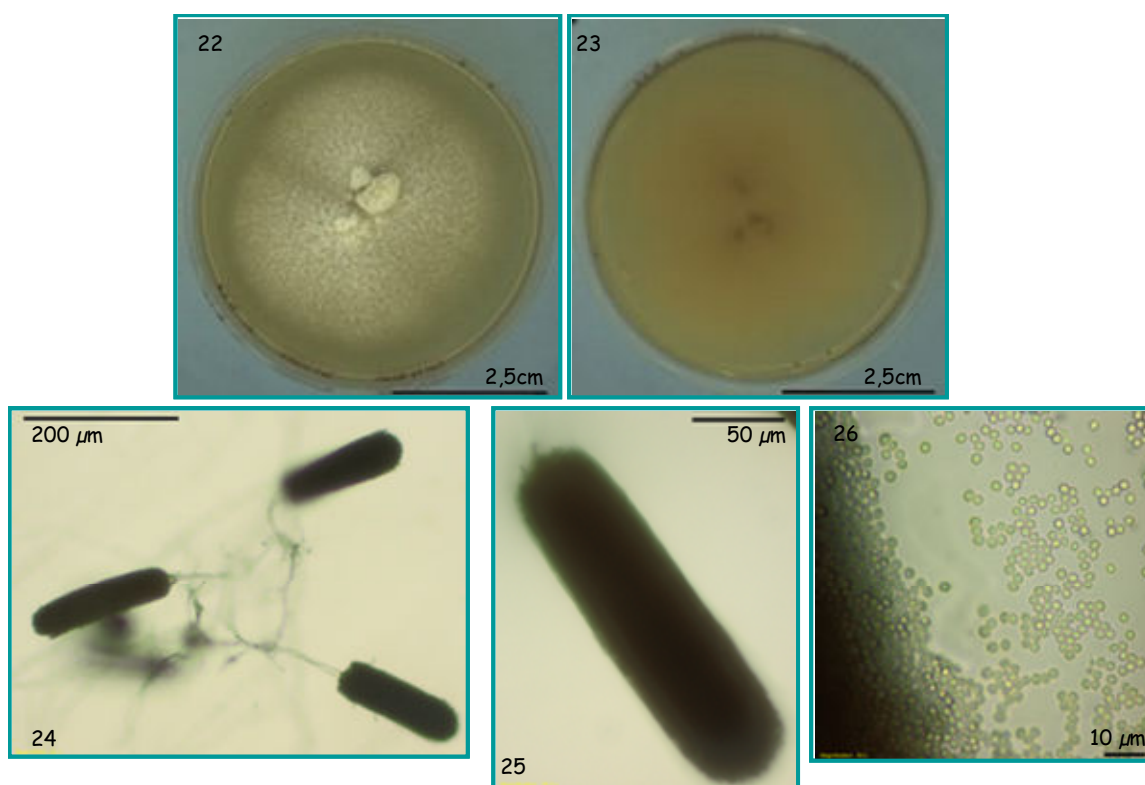


Figura 22-26: *Aspergillus terreus*; 22y23: colonia a los 7 días en AEM; 24y25: conidióforos; 26: conidios.

3. *Aureobasidium*

Aureobasidium es saprófito y su distribución es mundial. Se aísla de tierra, superficies de plantas, semillas, fruta, piel y uñas humanas. Es común en aire interior, prefiriendo lugares húmedos como baños, marcos de ventanas, maderas pintadas o piedra. *Aureobasidium* se engloba en un grupo denominado hongos parecidos a levaduras negras y pertenece al taxón Deuteromycota. *Aureobasidium pullulans* puede ocasionar infecciones oportunistas como micosis pulmonares y de la piel (de Hoog, 1999; Samson y col., 2004b).

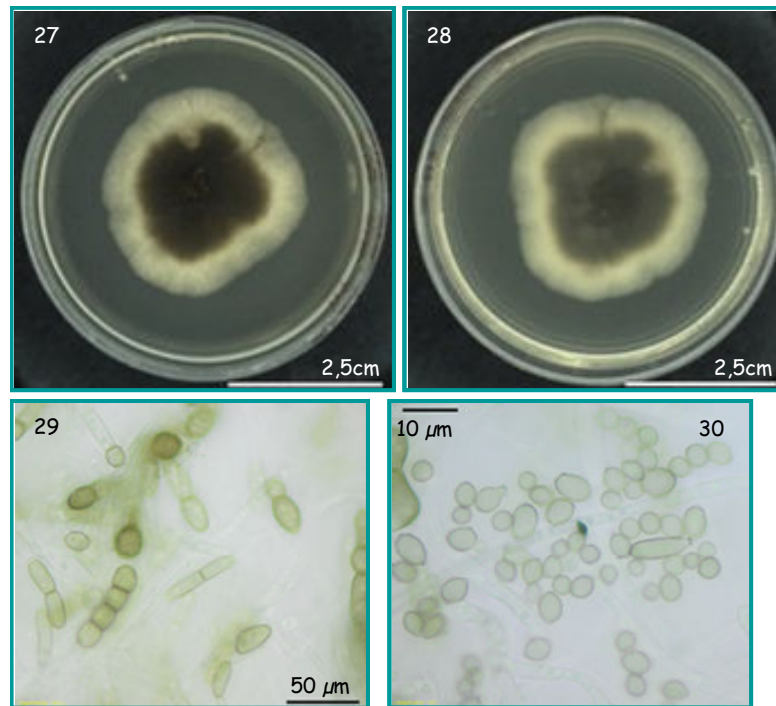
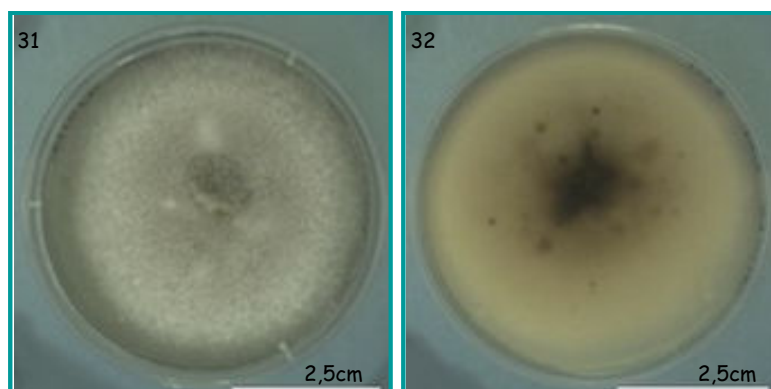


Figura 27-30 *Aureobasidium pullulans*; 27 y 28: colonia a los 7 días en AEM; 29: artroconidios; 30: conidios.

4. *Beauveria bassiana*



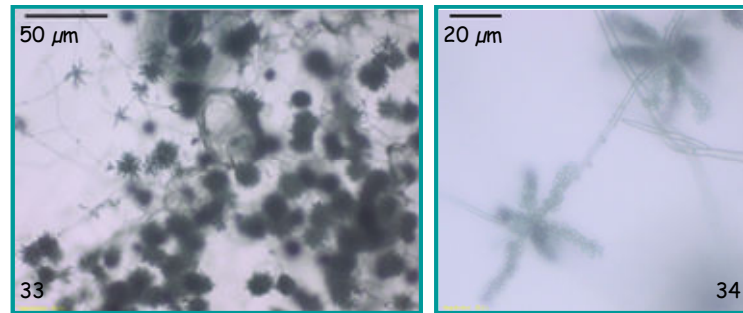
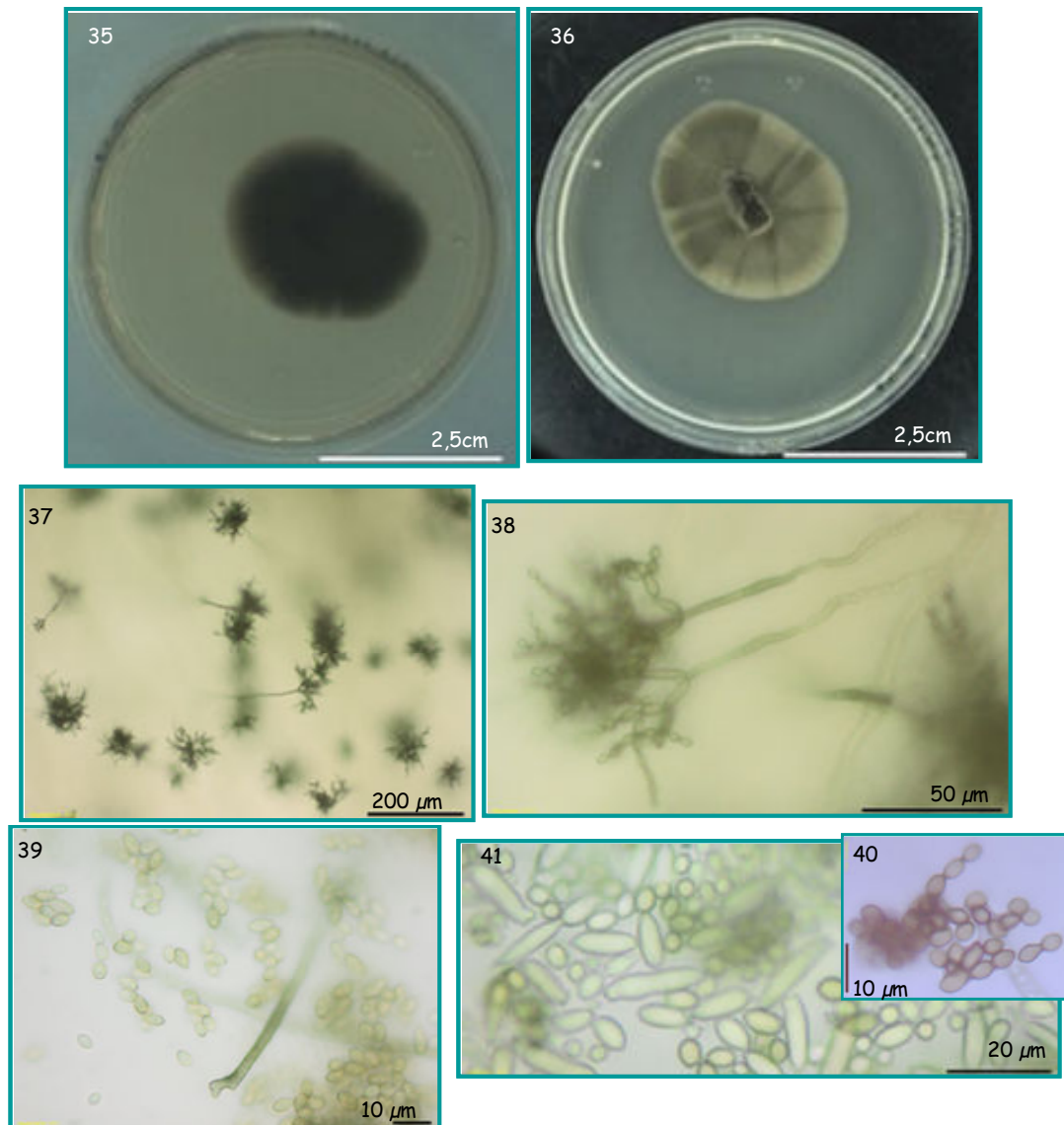


Figura 31-34: *Beauveria bassiana*; 31-32: colonia a los 7 días en AEM; 33-34: conidióforos.

Beauveria bassiana es un género que rara vez produce infecciones en humanos aunque si afecta a insectos, de hecho, se emplea como insecticida natural. Puede aislarse de restos de plantas, suelo, etc. (Rehner y col., 2005)

5. *Cladosporium*



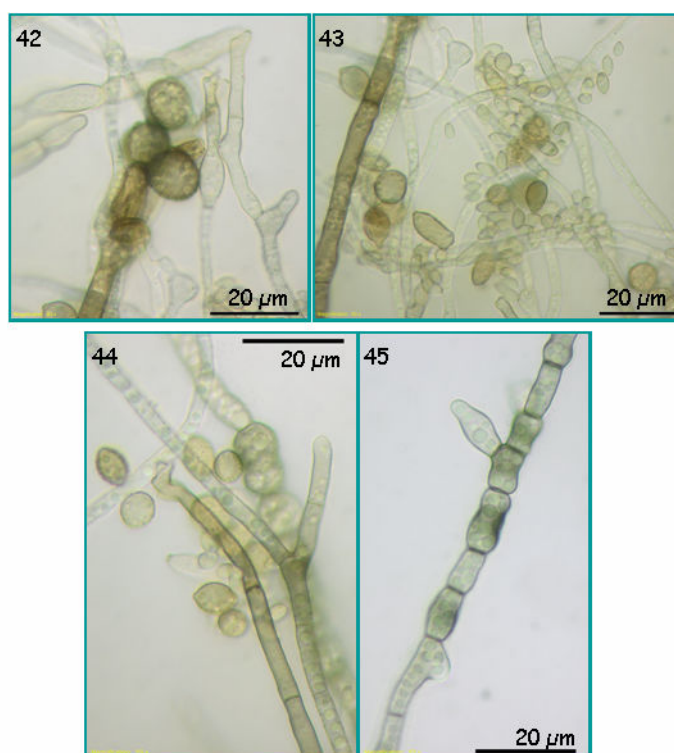


Figura 35-40 *Cladosporium phaenocoma*: 35 y 36: colonia a los 7 días en AEM; 37-39: conidióforos y conidios; 40: conidios; 41 conidios de *Cladosporium cladosporoides*; 42-45. conidios y conidióforos de *Cladosporium ramotenellum*.

Cladosporium es uno de los géneros más grandes y heterogéneos de los hifomicetos, conociéndose más de 772 nombres hasta la fecha (Dugan y col., 2004). Es muy común tanto en interiores, pudiendo aparecer en el techo del baño o en la cocina, como en exteriores. Frecuentemente coloniza hojas y plantas, y puede aislarse también de aire, suelo, comida, pinturas, textiles y otra materia orgánica. Algunas especies tienen relevancia médica ya que producen alérgenos y pueden causar micosis alérgicas en los pulmones (Ellis, 1971, 1976; de Hoog y col., 2000). Las colonias de *Cladosporium* se corresponden con el estado anamorfo (asexual) del hongo. Pertenecen al filo artificial Deuteromycota (hongos imperfectos o sin fase sexual conocida), catalogándose la fase sexual dentro del filo Ascomycota. Produce abundantes conidios con un máximo de concentración en las últimas semanas de verano y primeras de otoño (Bial-Aristegui, 2002).

6. *Epicoccum*

Epicoccum tiene una distribución mundial y es invasor de múltiples sustratos, como restos de plantas muertas, suelo, semillas, insectos, piel humana, textiles, etc. (Samson y col., 2004b). En ambientes interiores, se encuentra en moquetas, colchones, pinturas acrílicas expuestas, etc.

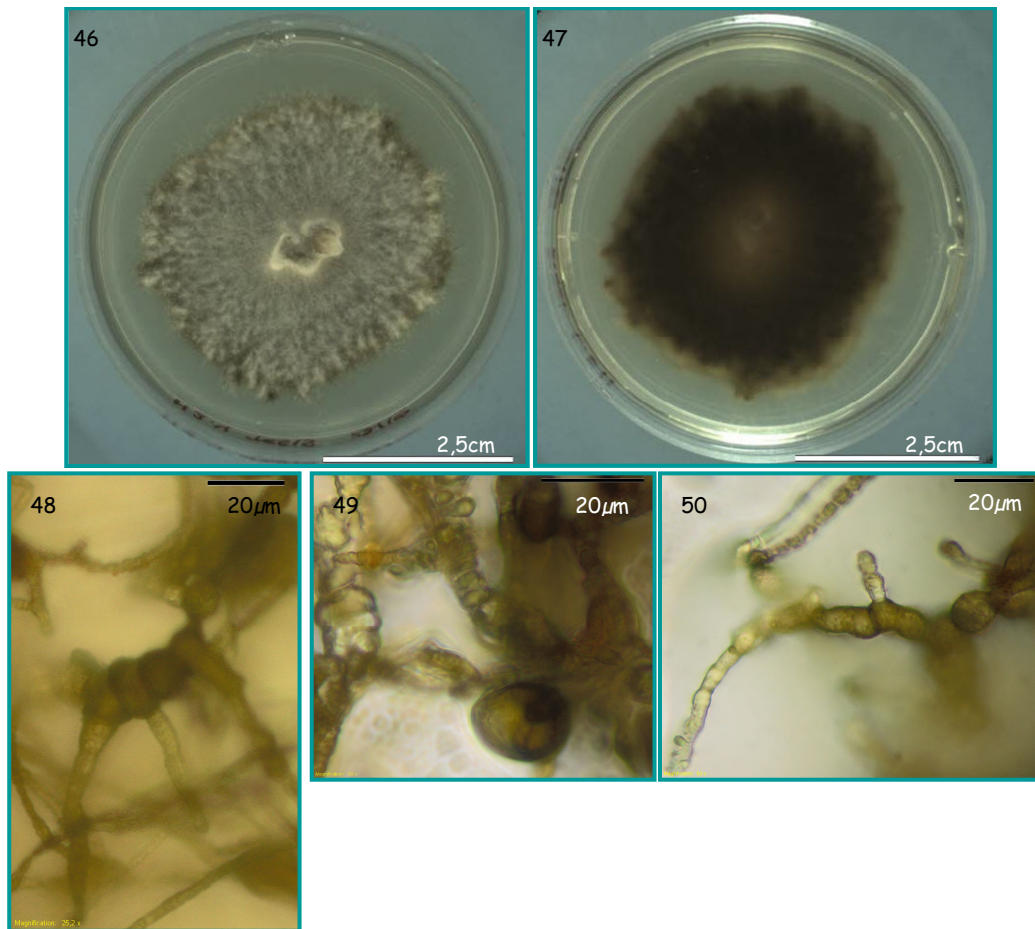


Figura 46-50: *Epicoccum nigrum*; 46-47: colonia a los 15 días en AEM; 48 y 49: esporodocios

7. *Penicillium*

Penicillium (género creado en 1809 por Link) es ubicuo y contaminante de múltiples sustratos. Forman parte de la micoflora de todos los suelos y participan en procesos de descomposición y biodeterioro. Los productos metabólicos que producen han sido muy útiles para la industria con numerosas aplicaciones como antibióticos (Penicilina), enzimas y ácidos orgánicos, así como en la fermentación de alimentos (quesos). Son responsables de micotoxicosis, alergias y problemas de aire interior (Samson y col., 2004a). Las colonias de *Penicillium* tienen gran variedad de formas y su aspecto es dependiente del medio en el que se ha inoculado. Muchas especies de *Penicillium* son contaminantes de sustratos variados y son productores de micotoxinas, por ello, la identificación hasta el nivel de especie es importante cuando se quiere determinar las consecuencias de una contaminación. Para su clasificación son útiles las características morfológicas, el perfil de metabolitos secundarios que producen, el patrón de crecimiento y la actividad de agua en diferentes medios. Otras características que pueden utilizarse son el olor y la producción de exudados (Samson y col., 2004b). Pertenecen al filo Deuteromycota, no habiéndose detectado ningún teleomorfo en el presente estudio.

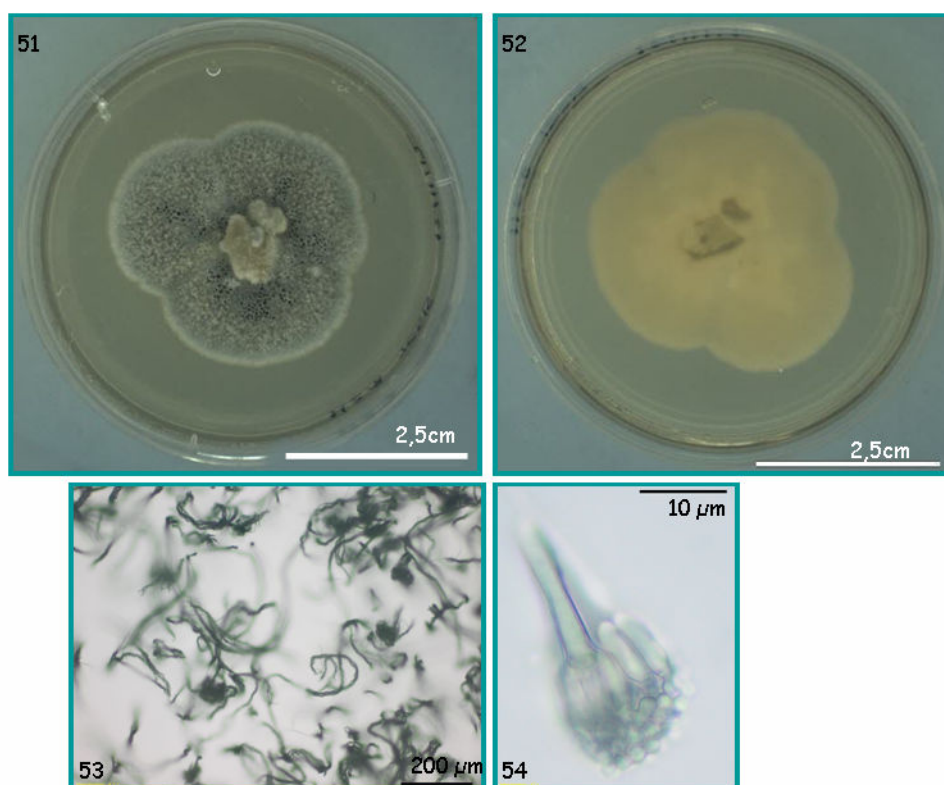


Figura 51-54: *Penicillium citrinum*; 51-52: colonia a los 7 días en AEM; 53y54: conidióforos.

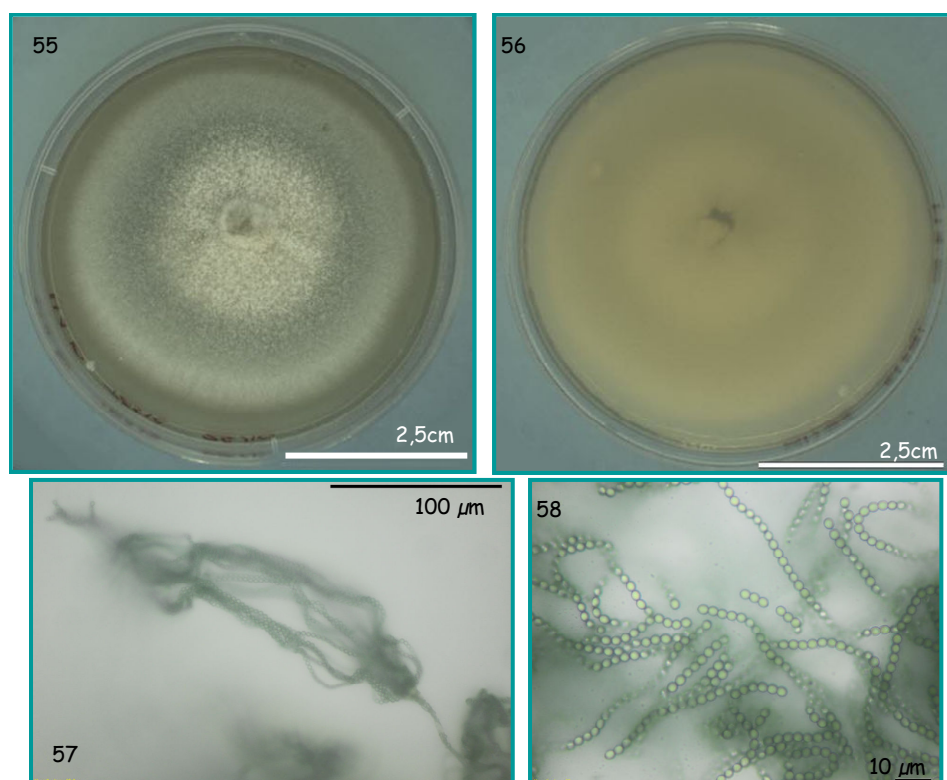


Figura 55-58: *Penicillium corylophilum*; 55y56: colonia a los 7 días en AEM; 57: conidióforo; 58: conidios.

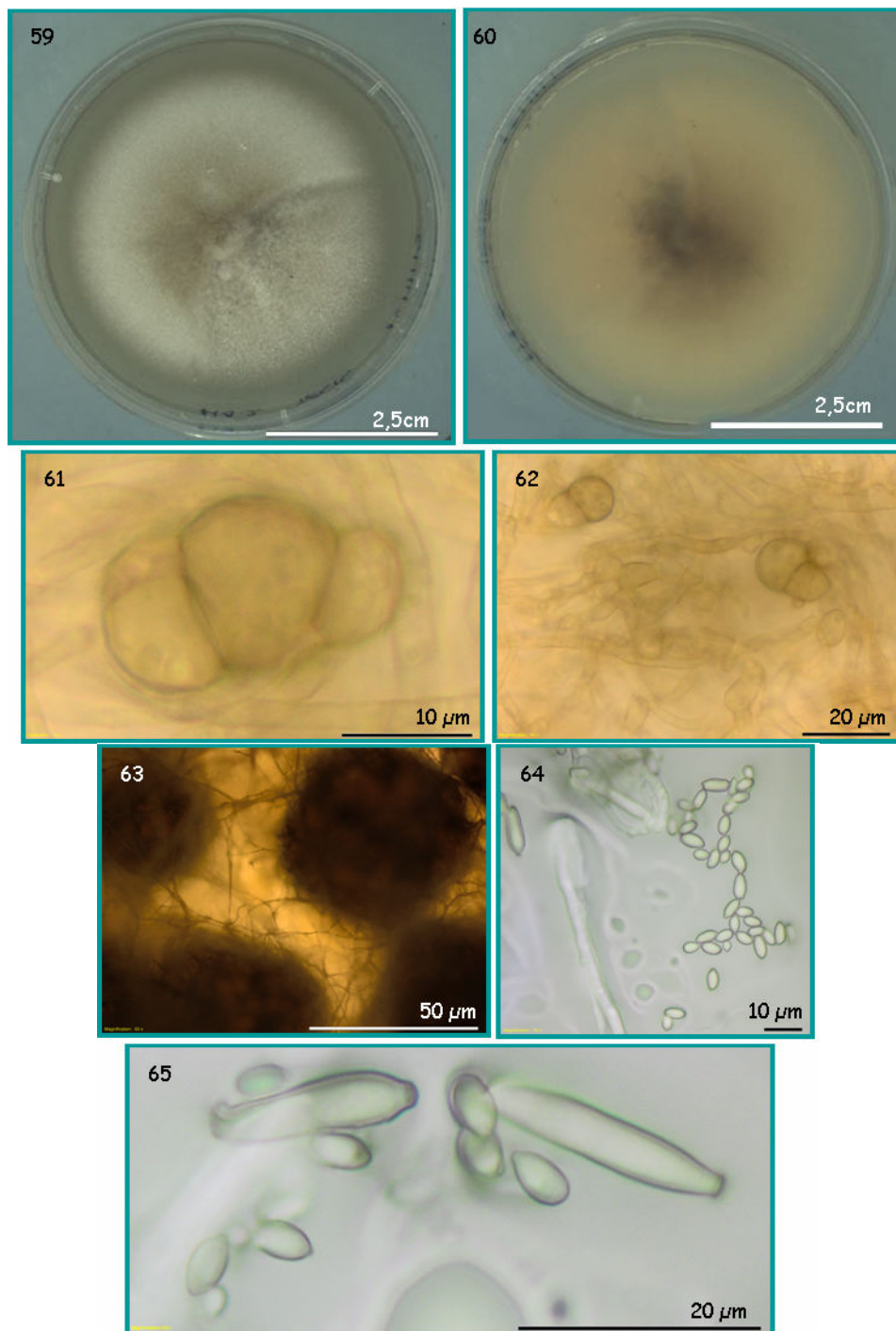
8. *Peyronellaea*, *Phoma* y *Strobilurus*

Figura 59-65. *Peyronellaea glomerata*; 59-60: colonias a los 7 días; 61 y 62: picnidios; **63-65:** *Phoma medicaginis*; 63: picnidios; 64 y 65: conidios.

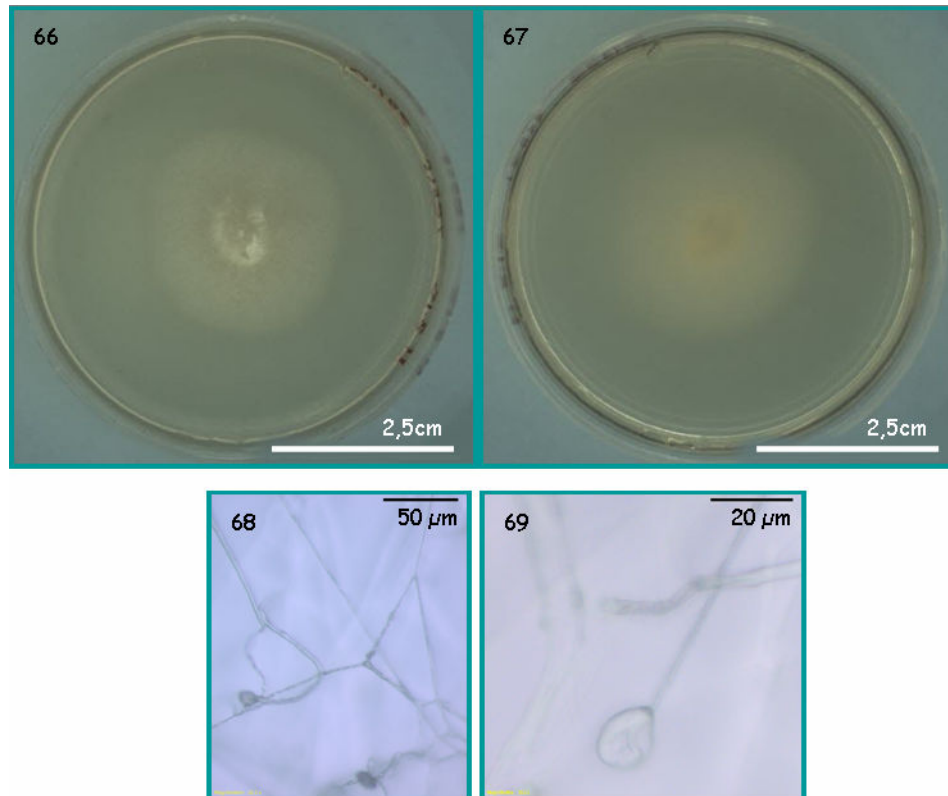


Figura 66-69: *Strobilurus esculentus*; 66 y 67: colonias a los 7 días en AEM.

Phoma es un género grande, con más de 2000 especies, que aparece en el suelo, como saprófito de plantas y ocasionalmente puede ser patógeno de plantas y humanos (Samson y col., 2004b). Pertenece al filo Deuteromycota y algunas de sus especies son capaces de producir clamidosporas. Algunas de las especies de *Peyronellaea* se clasificaron inicialmente dentro del género *Phoma*. *P. glomerata* se encuentra mundialmente distribuido en suelos, plantas, animales, materia inorgánica y alimentos. Pertenece al filo Deuteromycota (Deng y col., 2011). El género *Strobilurus* pertenece al filo Basidiomycota y al orden agaricales. *S. sculentus* es un hongo primaveral, poco común, formador de setas comestibles sobre conos de pinos en descomposición.

ANEXO II

